

VISIT...

LANZAROTE
Caliente.COM

DIAGNOSTIC MOLECULAR PATHOLOGY

A PRACTICAL APPROACH

Edited by

C.S. HERRINGTON and J. O' D. McGEE

**Nuffield Department
of Pathology and Bacteriology
John Radcliffe Hospital
Oxford, OX3 9DU UK**

**IRL PRESS
at OXFORD UNIVERSITY PRESS
Oxford • New York • Tokyo**

DIAGNOSTIC MOLECULAR PATHOLOGY

A PRACTICAL APPROACH

Edited by

C.S. HERRINGTON and J. O' D. McGEE

**Nuffield Department
of Pathology and Bacteriology
John Radcliffe Hospital
Oxford, OX3 9DU UK**

**IRL PRESS
at OXFORD UNIVERSITY PRESS
Oxford • New York • Tokyo**

Молекулярная клиническая диагностика

Методы

Под редакцией
С. Херрингтона и Дж. Макги

Перевод с английского
канд. биол. наук А. А. Лушниковой,
канд. биол. наук Л. И. Новиковой
и канд. биол. наук П. А. Сломинского

под редакцией
д-ра мед. наук Г. И. Козинца
и канд. биол. наук П. А. Сломинского



ИЗДАТЕЛЬСТВО «МИР» 1999

УДК 576.32

ББК 28.04

X39

X39 Молекулярная клиническая диагностика. Методы: Пер. с
англ. / Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги. — М.: Мир, 1999. —
558 с., ил.

ISBN 5-03-003060-3

В книге авторитетного коллектива авторов из Англии, Голландии, Испании, США и других стран подробно описаны новейшие молекулярно-диагностические методы, которые находят все более широкое применение в клинических лабораториях. Среди них: иммуноцитохимическое генотипирование клеток и его использование для диагностики раковых заболеваний; гибридизация *in situ*, позволяющая обнаруживать специфические нуклеиновые кислоты в интактных клетках, срезах тканей и мазках; полимеразная цепная реакция и ее применение для выявления минимальных количеств вирусной ДНК в тканях и цитологических препаратах. Описаны также методы определения отцовства и идентификации личности.

Для иммунологов, вирусологов, онкологов, молекулярных биологов.

ББК 28.04

Редакция литературы по биологии

ISBN 5-03-003060-3 (рус.)
ISBN 0-19-963238-3 (англ.)

© 1992 IRL Press Limited
© перевод на русский язык, «Мир», 1999

ПРЕДИСЛОВИЕ

Успехи, достигнутые в молекулярной клинической диагностике за последние 20 лет, связаны в основном с применением генно-инженерных методов и моноклональных антител. Моноклональные антитела стали широко использоваться в клинических лабораториях только в последние 10 лет, хотя впервые они были получены в 1975 г. Можно предположить, что в ближайшее время рутинными в клинической диагностике станут и генно-инженерные методы, в первую очередь благодаря разработке более простых и чувствительных нерадиоактивных методов выявления нуклеиновых кислот. Генотипирование и фенотипирование интактных клеток и их гомогенатов помогут установить этиологию многих болезней, например исследовать молекулярные основы наследственных заболеваний, разработать методы диагностики СПИДа, папилломатоза и др. С их применением появится возможность глубже понять механизмы опухолевых процессов и прогнозировать их развитие.

Цель этой книги — дать подробное описание большинства используемых сейчас методов молекулярной клинической диагностики и рассмотреть их возможности и ограничения. Все авторы — специалисты в своей области, имеющие опыт практического применения предлагаемых ими методов. Подробные протоколы не только помогут освоить соответствующие методики тем, кто никогда не имел с ними дело, но и окажутся полезными опытным исследователям.

В первых трех главах рассмотрены методы иммуноцитохимического фенотипирования клеток с использованием световой и электронной микроскопии и их применение в диагностике раковых заболеваний. Далее проанализированы принципы и методы обнаружения специфических нуклеиновых кислот при помощи гибридизации *in situ* с изотопно и неизотопно мечеными зондами, причем одинаковое внимание уделено внутриклеточной локализации как ДНК, так и РНК. Одна глава посвящена имеющей большое клиническое значение проблеме выявления вирусных геномов в тканях и цитологических мазках. В следующей главе рассмотрена сравнительно новая методика — так называемая интерфазная цитогенетика, обсуждается ее применение для изуче-

ния наследственных нарушений в опухолевых клетках человека. Большое внимание уделено анализу районов ядрышкового организатора и фибриллярных центров в норме и патологии, имеющему большое значение для диагностики раковых заболеваний. Одна из глав посвящена методам проточной цитометрии, позволяющим оценить содержание ДНК в клетке и провести фенотипирование клеток периферической крови.

Большое место занимает обсуждение методов анализа нуклеиновых кислот, выделенных из клинических образцов тканей и биологических жидкостей. Описаны способы выделения нуклеиновых кислот из тканей, получения и мечения зондов, методы гибридизации на фильтрах. Отдельная глава посвящена вопросам секвенирования ДНК. В трех главах рассмотрено использование для клинической диагностики полимеразной цепной реакции (ПЦР): ее применение для генетического анализа биоптатов, а также для выявления вирусных геномов в тканях и цитологических препаратах. Приведены протоколы, позволяющие обнаруживать с помощью генно-инженерных методов патогенные вирусы (прежде всего вирусы папилломы). В отдельной главе описаны принципы и методы определения отцовства, применяющиеся в судебной медицине и в целях пренатальной диагностики в семьях с наследственными заболеваниями. В последней главе рассмотрены вопросы скрининга генетических нарушений в архивных препаратах тканей и его использования для диагностики и прогноза развития опухолей.

Молекулярная клиническая диагностика — быстро развивающаяся область, и по мере расширения спектра клинических препаратов, поддающихся анализу молекулярными методами, она будет играть все большую роль в диагностике заболеваний и их прогнозировании. Нашей целью было дать всем заинтересованным лицам исчерпывающую информацию по имеющимся на сегодняшний день методам, и мы хотели бы выразить нашу благодарность всем авторам этой книги и издательству Oxford University Press за их помощь в достижении этой цели.

*С. Херрингтон
Дж. Макги*

СПИСОК АВТОРОВ

HEIDI M. BAUER

Department of Infectious Diseases, Cetus Corporation, 1400 53rd Street, Emeryville, CA 94608, USA.

ANNE E. BISHOP

Department of Histochemistry, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, UK.

RICHARD S. CAMPLEJOHN

Richard Dimbleby Department of Cancer Research, St Thomas' Hospital, London SE1 7EH, UK.

VICTOR T-W. CHAN

Department of Medicine, Hematology/Oncology Division, Beth Israel Hospital, 330 Brookline Avenue, Boston, MA 02215, USA.

JOSEPH A. CHIMERA

Roche Institute of Molecular Biology, 1912 Alexander Drive/7 Southern Kings Parkway, Research Triangle Park, NC 27709, USA.

JOHN CROCKER

East Birmingham Hospital, Bordesley Green, Birmingham, UK.

MARCIA EISENBERG

Roche Institute of Molecular Biology, 1912 Alexander Drive/7 Southern Kings Parkway, Research Triangle Park, NC 27709, USA.

KEVIN C. GATTER

University of Oxford, Nuffield Department of Pathology and Bacteriology, John Radcliffe Hospital, Oxford OX3 9DU, UK.

CATHERINE E. GREER

Department of Infectious Diseases, Cetus Corporation, 1400 53rd Street, Emeryville, CA 94608, USA.

Q. A. HAMID

National Heart and Lung Institute, Dovehouse Street, London SW3, UK.

C. SIMON HERRINGTON

University of Oxford, Nuffield Department of Pathology and Bacteriology, John Radcliffe Hospital, Oxford OX3 9DU, UK.

ANDREW R. HERYET

University of Oxford, Nuffield Department of Pathology and Bacteriology, John Radcliffe Hospital, Oxford OX3 9DU, UK.

ANTON H. N. HOPMAN

Department of Molecular Cell Biology, University of Limburg, PO Box 616, 6200 MD Maastricht, The Netherlands.

H. ITO

Department of Pathology, Hiroshima University of Medicine, 1-2-3 Kasumi, Minamiku, Hiroshima 734, Japan.

MEIRION B. LLEWELYN

MRC Molecular Biology Laboratory, Hills Road, Cambridge CB2 2QH, UK.

M. MICHELE MANOS

Department of Infectious Diseases, Cetus Corporation, 1400 53rd Street, Emeryville, CA 94608, USA.

JUAN-CARLOS MARTINEZ-MONTERO

Anatomia Patologica, Instituto Oftalmico, Madrid, Spain.

BRUCE J. McCREEDY

Roche Institute of Molecular Biology, 1912 Alexander Drive/7 Southern Kings Parkway, Research Triangle Park, NC 27709, USA.

JAMES O'D. McGEE

University of Oxford, Nuffield Department of Pathology and Bacteriology, John Radcliffe Hospital, Oxford OX3 9DU, UK.

CHRIS J. L. M. MEIJER

Department of Pathology, Section of Molecular Pathology, Free University Hospital, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands.

PETER W. J. MELKERT

Department of Pathology, Section of Molecular Pathology, Free University Hospital, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands.

OLAF MOESKER

Department of Pathology, University Hospital, Nijmegen, The Netherlands.

PINO PODDIGHE

Department of Molecular Cell Biology, University of Limburg, PO Box 616, 6200 MD Maastricht, The Netherlands.

JULIA M. POLAK

Department of Histochemistry, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, UK.

FRANS C. S. RAMAEKERS

Department of Molecular Cell Biology, University of Limburg, PO Box 616, 6200 MD Maastricht, The Netherlands.

DARRYL K. SHIBATA

Department of Pathology, University of Southern California School of Medicine, 1200 N State St 736, Los Angeles, CA 90033, USA.

PETER J. F. SNIJDERS

Department of Pathology, Section of Molecular Pathology, Free University Hospital, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands.

JULIA E. STICKLAND

University of Oxford, Nuffield Department of Pathology and Bacteriology, Level 4, Academic Block, John Radcliffe Hospital, Oxford OX3 9DU, UK.

STINA M. SYRJÄNEN

Department of Pathology, University of Kuopio, PO Box 1627, SF-70211 Kuopio, Finland.

E. TAHARA

Department of Pathology, Hiroshima University of Medicine, 1-2-3 Kasumi, Minamiku, Hiroshima 734, Japan.

CATHERINE M. TIMSON

Department of Histochemistry, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, UK.

ADRIAAN J. C. VAN DEN BRULE

Department of Pathology, Section of Molecular Pathology, Free University Hospital, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands.

SUSAN VAN NOORDEN

Department of Histochemistry, Royal Postgraduate Medical School, Hammersmith Hospital, London W12 0NN, UK.

JAN M. M. WALBOOMERS

Department of Pathology, Section of Molecular Pathology, Free University Hospital, De Boelelaan 1117, 1081 HV Amsterdam, The Netherlands.

ERIC P.-H. YAP

University of Oxford, Nuffield Department of Pathology and Bacteriology, John Radcliffe Hospital, Oxford OX3 9DU, UK.

W. YASUI

Department of Pathology, Hiroshima University of Medicine, 1-2-3 Kasumi, Minamiku, Hiroshima 734, Japan.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ААФ	ацетиламинофлуорен
АЭК	3-амино-9-этилкарбазол
БОТ	буфер для обратной транскриптазы
БСА	бычий сывороточный альбумин
БУДР	бромурацилдезоксирибозид
БХИФ	5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат
ВИЧ	вирус иммунодефицита человека
ГБ	гибридизационный буфер
ГИС	гибридизация <i>in situ</i>
ГМА	гликольметакрилат
ГТЭ	глюкоза—трис—ЭДТА
ДАБ	3, 3'-диаминобензидин
ДАФИ	4', 6-диамино-2-фенилндо
ДМСО	диметилсульфоксид
ДМФ	диметилформамид
ДСН	додецилсульфат натрия
ДТТ	дитиотрейтол
ДЭАК	диэтиламинокумарин
ДЭПК	диэтилпирокарбонат
ЖХВР	жидкостная хроматография высокого разрешения
ИМФ	иммунофлуоресценция
ИМП	иммунопероксидаза
ИП	иодистый пропиций
ИЦХ	иммуноцитохимия
МУК	метанол/уксусная кислота
МЭ	меркаптоэтанол
НГИС	неизотопная гибрилизация <i>in situ</i>
НКС	нормальная кроличья сыворотка
НСС	нормальная свиная сыворотка
НСТ	нитросиний тетразолий
НСЧ	нормальная сыворотка человека
НЭС	нейроэндокринная система
ПААГ	полиакриламидный гель
ПАП	пероксидаза—антипероксидаза
ПВП	поливинилпирролидон
ПДАФ	полиморфизм длины амплифицированных фрагментов
ПДРФ	полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
ПЛЛ	поли-L-лизин
ПЛП	периодат—лизин—параформальдегид
ПЛПГ	периодат—лизин—параформальдегид—глутаральдегид

ПХ	пероксидаза хрена
ПЦР	полимеразная цепная реакция
ПЭГ	полиэтиленгликоль
РИА	радиоиммунологический анализ
РФ	репликативная форма
СМЖ	спинномозговая жидкость
СПК	сыворотка плода коровы
ТАБ	тонкоигльная аспирационная биопсия
ТАЭ	трис-ацетат-ЭДТА
ТБТ	ТСБ-БСА-тритон
ТБЭ	трис-борат-ЭДТА
ТСБ	трис-солевой буфер
ТХУ	трихлоруксусная кислота
ТЭ	трис-ЭДТА
ТЭА	триэтаноламин
ТЭД	трис-ЭДТА-ДТТ
ФДП	л-фенилендиаминпирокатехол
ФИТЦ	флуоресцеинизотиоцианат
ФСБ	фосфатно-солевой буфер
ЩФ	щелочная фосфатаза
ЩФАЩФ	щелочная фосфатаза-антищелочная фосфатаза
ЯОР	район ядрышкового организатора
ABC	авидин-биотиновый комплекс
CMV	цитомегаловирус
EBV	вирус Эпштейна-Барр
ELISA	ферментный иммуносорбентный анализ
HBV	вирус гепатита В
HPV	вирус папилломы человека
HSV	вирус простого герпеса
MEM	модифицированная среда Игла
MOPS	3-(N-морфино)пропансульфоновая кислота
OCT	среда, обеспечивающая оптимальные условия разрезан
	при данной температуре
PIC	информационная емкость полиморфизма
SSC	стандартный солевой раствор
SSCP	одноцепочечный конформационный полиморфизм
SSPE	стандартный солевой раствор-ЭДТА
TdT	терминальная дезоксинуклеотидилтрансфераза
TEMED	N', N', N'-тетраметилэтилендиамин
VNTR	варьирующее число tandemных повторов

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕТОДЫ, ИСПОЛЬЗУЮЩИЕСЯ В КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Джеймс О'Д. Макги

1. Введение

В начале XIX в. изучение всех патологий ограничивалось простыми визуальными наблюдениями. Установление причин заболеваний на клеточном уровне стало возможно только после создания микроскопов. Примерно в то же время патологи (врачи) стали использовать в своей работе бактериологические и иммунологические методы, а позже получили развитие клиническая биохимия, гематология, вирусология, цитогенетика. Первые патологи описали морфологические признаки многих заболеваний, а в ряде случаев — этиологию некоторых бактериальных и вирусных инфекций, и эти старые записи послужили основой науки о патологических состояниях. Главная задача молекулярной клинической диагностики состоит в том, чтобы по возможности точно установить причины заболевания и механизмы его развития. В настоящее время, однако, ни один ученый не может в совершенстве владеть всеми лабораторными методами диагностики заболеваний, уметь прогнозировать ход патологического процесса и влияние на него терапии. В первую очередь это связано с тем, что современные методы исследования клеток, тканей и тканевых жидкостей высокоспециализированы и один человек практически неспособен освоить все их.

Молекулярную клиническую диагностику определяют как науку, занимающуюся выявлением патологий, изучением на молекулярном уровне причин их возникновения и механизмов развития. При этом «молекулярный уровень» включает не только гены и мРНК, но и соответствующие белковые продукты. Насколько это известно, все соматические клетки (кроме лимфоцитов) содержат одинаковый набор генов, но только экспрессирующиеся гены влияют на функционирование клетки как в норме, так и при патологии.

Молекулярная клиническая диагностика в том смысле, какой мы вкладываем в это понятие сейчас, стала по-настоящему развиваться только с начала 70-х годов. Этому способствовали два крупных научных события, произошедших в 1975 г.: открытие моно-

клональных антител и создание метода гибридизации на фильтрах. В результате первого из них появилась возможность получать в больших количествах антитела, взаимодействующие с определенными эпитопами (антигенными детерминантами). Второе имело не менее важные последствия, поскольку существовавшие до этого методы электрофоретического разделения нуклеиновых кислот не обладали достаточным разрешением — вместо четкой полосы в геле выявлялось размытое пятно. Состав этого пятна не удавалось определить до тех пор, пока Саузерн не предложил метод переноса ДНК после электрофореза на фильтры с последующей гибридизацией иммобилизованных молекул со специфическими изотопно мечеными зондами, связывающимися только с определенными молекулами ДНК. Затем были разработаны методы Норзерн- и Вестерн-блоттинга, позволяющие выявлять индивидуальные РНК и белки. Несколько позже сразу две группы ученых описали методы определения первичной структуры нуклеиновых кислот, и наконец, еще одним важным событием в молекулярной биологии и ее использовании в молекулярной клинической диагностике стало открытие в 1985 г. полимеразной цепной реакции. Это достижение вместе со всеми предыдущими полностью изменило содержание молекулярной клинической диагностики.

2. Молекулярная клиническая диагностика

Молекулярные диагностические исследования можно проводить на 1) интактных специфических клетках или 2) тканевых и клеточных экстрактах. В первом случае проводят гено- и фенотипирование клеток, находящихся в том виде, в каком они присутствуют в интактной ткани. Во втором определяют преобладающие генотип и фенотип исследуемого препарата без учета того, что и в норме, и при патологии он состоит из множества типов клеток. Например, в печени, которую используют во многих экспериментах как гомогенную ткань, присутствуют клетки по меньшей мере 15 типов. Это один из недостатков исследования тканевых экстрактов, и в настоящее время его проводят параллельно с определением генотипа и фенотипа входящих в данную ткань изолированных интактных клеток.

2.1. Фенотипирование

Определить фенотип клеток — как циркулирующих в крови, так и входящих в состав сложной ткани — не составляет особого труда. Чаще всего при этом используют подход, основанный на

способности клеток связывать специфические антитела. Существует много различных иммуноцитохимических методов, но все они преследуют одну цель — выявление в ткани тех или иных полипептидов. Получаемые данные позволяют исследовать процессы дифференцировки клеток, что особенно важно для прогнозирования развития лимфом, лейкозов и солидных опухолей. За последнее десятилетие получено много важных с диагностической точки зрения антител; многие из них имеются в продаже. Сегодня в принципе можно получить антитела к любому белку (или его фрагменту) с установленной аминокислотной последовательностью или нуклеотидной последовательностью соответствующей ДНК. Можно также исследовать функцию генов, клонированных с помощью методов обратной генетики; для этого синтезируют пептиды, кодируемые данной последовательностью, получают антитела к ним и используют эти антитела для фенотипирования тканей. Если такие пептиды пришить к молекулам большого размера, то они будут обладать достаточной иммуногенностью для получения моноклональных и поликлональных антител. Чаше при этом используют моноклональные антитела, но поликлональные антитела обладают рядом преимуществ (если не считать того, что их нельзя получать в неограниченном количестве): они направлены против большого числа эпитопов, имеют более высокую константу связывания и соответственно обеспечивают большую чувствительность. Фенотипирование проводят с помощью как световой, так и электронной микроскопии. Для визуализации полипептидов в клетках в обоих случаях используют меченые антитела. При световой микроскопии метками служат ферменты или флуорохромы, а при электронной микроскопии — электроплотные маркеры.

2.2. Генотипирование

Для выявления в интактных клетках экзогенных и эндогенных нуклеиновых кислот используют гибридизацию *in situ*. Таким способом легко определить набор хромосом в клетках как взрослого организма, так и плода. Исследуя *in situ* клетки амниотической жидкости или ворсинки хориона, устанавливают пол плода, что очень важно для пренатальной диагностики заболеваний, сцепленных с полом. Эти же клетки можно использовать для выявления трисомии, лежащей в основе синдрома Дауна. Определяя кариотип клеток, пытаются исследовать патогенез опухолей. Гибридизация *in situ* с геномными или РНК-зондами позволила луч-

ше понять особенности дифференцировки специфических клеток и их роль в развитии патологий.

Гибридизация *in situ* все шире используется для диагностики вирусных и других инфекционных заболеваний. Большой интерес, в частности, вызывает вирус папилломы человека (HPV), предположительно играющий роль в развитии рака шейки матки. Уже разработаны и повсеместно используются для диагностики заболеваний шейки матки методы обнаружения этого вируса. Аналогичным образом, легко идентифицируются цитомегаловирус, вирус иммунодефицита человека (ВИЧ), вирус Эпштейна—Барр (EBV). С помощью гибридизации *in situ* и техники полимеразной цепной реакции (ПЦР) можно диагностировать и невирусные инфекционные заболевания, например часто возникающую у больных СПИДом пневмонию, вызываемую *Pneumocystis carinii*. В принципе же эти методы позволяют идентифицировать любую инфекцию. В будущем появится возможность типировать бактерии и вирусы, а также определить генетические детерминанты их вирулентности.

Метод гибридизации *in situ* расширяет возможности цитогенетики, поскольку позволяет устанавливать хромосомную локализацию индивидуальных генов. Это имеет огромное значение для выяснения структурной организации хромосом, построения их физических карт, выявления сцепленных генов. Но пока молекулярная цитогенетика применяется в диагностических лабораториях не очень широко.

Интактные клетки изучают и другими методами — такими, как проточная цитометрия или определение числа районов ядрышкового организатора (ЯОР). Проточная цитометрия используется для фенотипирования и предварительного генотипирования клеток и применяется в основном для определения подтипов лимфоцитов и пloidности опухолевых клеток. Последнее имеет прогностическое значение при некоторых опухолях. ЯОР выявляются при простом окрашивании серебром. Определение их числа дает информацию о биологии опухолей и имеет определенное диагностическое значение, однако не позволяет четко отличать доброкачественные опухоли от злокачественных.

2.3. Анализ экстрактов тканей

Вероятно, наиболее существенный вклад молекулярных методов в диагностику различных патологий связан с изучением молекулярных нарушений при моногенных наследственных заболева-

ниях. Сейчас возможна пренатальная диагностика многих таких заболеваний, что позволяет снять обеспокоенность будущих родителей и дает большой экономический и социальный эффект. Раньше для выявления молекулярных нарушений при наследственных заболеваниях использовали метод, основанный на полиморфизме длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Сегодня в отдельных семьях удастся идентифицировать многие специфические нарушения, лежащие в основе наследственных заболеваний, на уровне генов. При этом оказалось, что заболевания, неразличимые по клиническим проявлениям, на молекулярном уровне могут различаться. Это очень важно для пренатальной диагностики.

Иногда при проведении пренатальной диагностики приходится решать такую проблему, как установление отцовства. Большую помощь в этом могут оказать методы рекомбинантных ДНК с использованием техники «отпечатков пальцев» (молекулярной дактилоскопии), которые позволяют точно установить родство ребенка с его предполагаемым отцом. До недавних пор в качестве исходного материала для пренатальной диагностики использовали клетки ворсинок хориона или амниотической жидкости. Однако, поскольку в первом триместре беременности в крови матери присутствуют клетки плода, при успешном разделении этих клеток и циркулирующих клеток крови матери для пренатальной диагностики можно будет использовать пробы крови беременной женщины. Пока же такая диагностика затрудняется тем, что на фоне большого количества материнской ДНК в крови трудно выявить генетический материал плода. Тем не менее этот метод позволяет определить пол плода в 75% случаев [1, 2]. Его очевидное преимущество состоит в том, что он не требует проведения довольно рискованных процедур амниоцентеза или биопсии ворсинок хориона; в настоящее время этот метод применяется для выявления моногенных заболеваний [3].

Основными методами при молекулярном диагностическом исследовании ткани как целого являются блот-гибридизация по Саузерну, Нозерн-гибридизация и секвенирование. Сейчас проведение соответствующих тестов упростилось благодаря возможности многократной амплификации всего нескольких молекул нуклеиновых кислот методом ПЦР. Это позволяет проводить экспресс-анализ, располагая минимальными количествами ДНК, полученными, например, из смыва ротовой полости или из пробы крови, взятой из пальца. Усовершенствованные методы идентификации ДНК, амплифицированной с помощью ПЦР, позволяют устанавливать причины вирусных и наследственных заболеваний.

Так, больших успехов удалось достичь в выявлении в образцах тканей вируса папилломы, вируса иммунодефицита человека, цитомегаловируса, вируса гепатита С, хламидий.

Молекулярная клиническая диагностика не только позволяет исследовать патогенез инфекционных и наследственных заболеваний; она используется также для характеристики солидных опухолей — например, с ее помощью можно исследовать перестройки генов в лимфомах. Одна из проблем в изучении таких опухолей связана с тем, что последние помимо раковых клеток содержат разнообразные обеспечивающие их рост стромальные клетки, например клетки кровеносных сосудов. В большинстве опухолей присутствует более 15 типов стромальных клеток, а опухолевые клетки вследствие амплификации и делеций части генома *per se* отличаются в свою очередь от клеток стромы. И хотя исследование ткани как целого не позволяет различать типы клеток, оно все же дает полезную информацию. Недавно были разработаны методы выявления нарушений нуклеиновых кислот в клетках архивных биоптатов опухолей. По-видимому, наиболее широко используется сравнительно простой метод анализа одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP), который дает возможность выявлять нормальные и мутантные аллели генов в микропробах тканей. Этот генетический скрининг позволил обнаружить мутантные онкогены, амплификации и делеции в ДНК спорадических опухолей. Все эти методы дают ценную научную и клиническую информацию, а одним из самых больших достижений является идентификация генетических нарушений, лежащих в основе предопухолевого состояния и имеющих прогностическое значение в случае метастазирующих опухолей. При этом очень ценным объектом исследований являются архивные биоптаты, поскольку для них известны клинические проявления таких нарушений. Подобные тесты позволяют быстро выяснить, является ли новый предполагаемый маркер значимым для диагностики опухоли и прогнозирования ее развития.

2.4. Перспективы

Практически все методы анализа нуклеиновых кислот, применявшиеся примерно до 1982 г., основывались на использовании изотопно меченных зондов. Однако в последние 15 лет появилось множество нерадиоактивных меток — таких как биотин, дигоксигенин, флуорохромы, биолюминесцентные и хемилюминесцентные вещества. Эти метки не обеспечивают столь высокой чувстви-

тельности, как изотопные, но обладают тем преимуществом, что их можно широко использовать в клинических лабораториях, не подвергаясь риску радиоактивного облучения. По-видимому, к концу века нерадиоактивные методы анализа в диагностических лабораториях станут рутинными.

Методы гено- и фенотипирования интактных клеток и клеточных экстрактов разрабатывались практически независимо, однако в настоящее время — в основном благодаря появлению метода ПЦР — у них появляется все больше точек соприкосновения. Теоретически ПЦР дает возможность амплифицировать уникальный ген в интактной клетке до такой степени, что его удастся визуализировать и идентифицировать в специфических клетках с помощью гибридизации с меченым зондом [4, 5]. Однако здесь возникает ряд проблем. Прежде всего при проведении ПЦР *in situ* большая часть продуктов амплификации выходит из клетки. Возможно, эту проблему удастся решить, несколько изменив метод амплификации или приняв меры к сохранению ДНК в клетке. Есть надежда, что, объединяя все методы молекулярной клинической диагностики, мы сможем когда-нибудь идентифицировать нужный нам ген и его продукты среди огромного множества мРНК, белков и генов, присутствующих в одной клетке.

Литература

1. Lo Y.-M. D., Wainscoat J. S., Gillmer M. D. G., Patel P., Sampietro M., Fleming K. A. (1989). Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet*, ii, 1363.
2. Lo Y.-M. D., Patel P., Sampietro M., Gillmer M. D., Fleming K. A., Wainscoat J. S. (1990). Detection of single-copy fetal DNA sequence from maternal blood. *Lancet*, 335, 1463.
3. Camaschella C., Alfano A., Gottadi E. et al. (1990). Prenatal diagnosis of fetal haemoglobin Lefore-Boston disease on maternal peripheral blood. *Blood*, 75, 2102.
4. Haase At., Retzel E. F., Staskus K. A. (1990). Amplification and detection of lentiviral DNA inside cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 4971.
5. Nuovo G., MacConnell P., Forde A., Delvenne P. (1991). Detection of human papillomavirus DNA in formalin-fixed tissues by *in situ* hybridization after amplification by polymerase chain reaction. *Am. J. Pathol.*, 139, 847.

ИММУНОЦИТОХИМИЯ: СВЕТОВАЯ МИКРОСКОПИЯ*Эндрю Р. Хернет, Кевин С. Гаттер***1. Введение**

Идея локализации антигенов в тканях с помощью антител впервые была реализована в начале 40-х гг. Впоследствии иммуноцитохимические методы стали широко применяться в молекулярной клинической диагностике, а с середины 70-х гг., после открытия моноклональных антител, их роль еще более возросла.

Иммуноцитохимические методы позволяют локализовать и идентифицировать клеточные и тканевые компоненты (антигены), основываясь на их связывании с антителами. Место связывания определяют при помощи меченых антител или методом вторичного мечения. Использование такого подхода для выявления патологии на клеточном уровне позволяет детально исследовать функции и химический состав клеток и сопоставлять полученные результаты с известными морфологическими данными, что дает возможность глубже проникнуть в суть патологического процесса.

Использование антител лежит в основе исследований самых разных молекулярных образований: структурных компонентов клетки, клеточных продуктов (гормонов, ферментов, иммуноглобулинов), рецепторов на клеточной поверхности и т. д. Большинство антител связываются с компонентами и продуктами нормальных клеток, но некоторые специфичны в отношении антигенов, характерных для раковых клеток. Такие антитела использовались в качестве маркеров при исследовании процессов дифференцировки и трансформации клеток злокачественных новообразований. Однако наивно полагать, что с помощью антител можно прямо идентифицировать раковые клетки, скорее антитела лишь указывают на изменения картины генной экспрессии.

2. Выбор иммуноцитохимического метода

Из всего многообразия иммуноцитохимических методов (ИЦХ), играющих важную роль в молекулярной клинической

диагностике, нужно выбрать один, наиболее приемлемый для данной лаборатории. При этом выборе возникают следующие вопросы: как готовить, фиксировать и обрабатывать препараты тканей? Какие антитела и какую систему иммунодетекции использовать? Такое разнообразие методов дает большие преимущества при проведении научных исследований, но их использование в диагностических целях сопряжено с рядом ограничений, и выбор оказывается не таким уж большим. Выбирая тот или иной иммуноцитохимический метод для рутинной диагностики, учитывают следующие факторы.

- а. *Чувствительность.* Чувствительный метод позволяет выявлять даже небольшие количества антигена при минимальном фоновом окрашивании. Это зависит от avidности, аффинности и титра первых антител, а также от чувствительности метода детекции. Конечно, для точной диагностики лучше пользоваться высокочувствительными методами, но при выборе приходится учитывать их стоимость и быстроту.
- б. *Достоверность и воспроизводимость результатов.* При рутинном тестировании гораздо важнее воспроизводимость результатов, чем чувствительность метода. Так, простой метод, который состоит из небольшого числа процедур и использует обычные реактивы, дает меньше ошибок.
- в. *Стоимость.* С учетом стоимости реактивов и оборудования, а также времени, затрачиваемого на тестирование, иммуноцитохимические анализы могут быть довольно дорогими. Снизить их стоимость без ухудшения результатов может тщательный предварительный отбор.
- г. *Универсальность.* Метод должен быть пригоден для анализа всех типов тканей и их препаратов.
- д. *Возможность автоматизации и окрашивания партий препаратов.*
- е. *Безопасность.*

Выбор метода может зависеть и от личных предпочтений исследователя.

3. Изготовление препаратов

Как правило, в диагностических лабораториях для анализа используют кусочки ткани, фиксированные формалином, залитые в парафин и нарезанные с помощью стеклянного ножа. Эта схема применяется десятки лет и была разработана исходя из того, что

гистопатологи используют для диагностики исключительно морфологические критерии. Для иммуноцитохимиков, которых интересуют биологические характеристики препарата, она может оказаться неприемлемой. Главная проблема состоит в том, что при заливке в парафин и последующем изготовлении срезов могут разрушиться как раз те компоненты ткани, которые хотят исследовать. Так, возможна полная или частичная утрата этих компонентов, их химические изменения, маскирование антигена. Совершенство системы иммуномечения или уникальность первых антител не имеют значения, если антиген утрачен или не доступен для антитела.

Следовательно, важно помнить, что круг антигенов, которые можно выявить на парафиновых срезах, уже, чем на замороженных. Поэтому решение вопроса о том, фиксировать или замораживать препарат, зависит от выявляемых антигенов.

3.1. Тканевые срезы

3.1.1. Изготовление препаратов

Процедура фиксации или замораживания препаратов для ИЦХ должна быть очень быстрой, чтобы максимально сохранить антигенные компоненты и морфологию ткани и не допустить лизиса клеток, приводящего к потере и диффузии антигенов. Большинство хирургических биоптатов, если они хранятся нефиксированными в течение 24 ч при температуре 4 °С, остаются интактными. Очень маленькие биоптаты, которые исследуют в нефиксированном виде, необходимо предохранять от высыхания. Их транспортируют, завернув в смоченную солевым раствором марлю или поместив в специальную среду. ИЦХ-методами можно исследовать также образцы ткани, полученные при аутопсии, при этом чем быстрее начат анализ, тем лучше результаты. Ряд антигенов, например некоторые онкогенные белки или факторы роста, сохраняют целостность только при немедленном замораживании препарата.

3.1.2. Качество срезов

При любом способе приготовления срезы должны быть ровными, достаточно тонкими, однородными по толщине; помещать их нужно на чистые предметные стекла. Надорванные или «жатые» срезы должны быть отбракованы, поскольку все эти неоднородности затрудняют интерпретацию результатов.

3.1.3. Прикрепление срезов к предметным стеклам

Серьезной проблемой является потеря тканевых срезов во время окрашивания. Вероятность потерь высококачественных и достаточно сухих срезов меньше, но при работе с некоторыми тканями и длительных исследованиях она остается весьма высокой. В таких случаях можно покрывать стекла специальными адгезивами, не влияющими на последующие процедуры. Обычно при работе со срезами, приготовленными методом замораживания—высушивания, и с парафиновыми срезами, которые легко отделяются от подложки, мы покрываем стекла желатиной с алюмохромовыми квасцами. Плохо прилипают к стеклу ткани, подвергнутые кислотной декальцификации или недостаточно хорошо обработанные. Методика покрытия стекол желатиной с алюмохромовыми квасцами описана в протоколе 2.1. Если срезы предварительно обрабатывают протеолитическими ферментами, то желатинового покрытия может оказаться недостаточно для прочного прилипания срезов. В таких случаях можно использовать более сильные адгезивы, например поли-L-лизин [1] или органо-силан ([2]; см. также гл. 4).

Протокол 2.1. Покрытие предметных стекол желатиной с алюмохромовыми квасцами

1. Растворяют 2,5 г желатины в 500 мл дистиллированной воды, нагревая раствор до 50 °C при постоянном помешивании.
 2. После растворения желатины добавляют 0,25 г алюмохромовых квасцов и хорошо перемешивают раствор.
 3. Охлаждают раствор до комнатной температуры и хранят его при 4 °C.
 4. Перед использованием нагревают раствор до 60 °C и фильтруют в химический стакан.
 5. Погружают в раствор чистые предметные стекла, не касаясь их поверхностей. Вынимают стекла, помещают их на подставку и сушат в термостате при 60 °C не менее 1 ч. После охлаждения стекла можно хранить в коробках при комнатной температуре.
-

3.1.4. Криостатные срезы

Криостатные срезы лучше других подходят для выявления широкого спектра антигенов, однако при этом необходимо, чтобы

образцы тканей были получены и хранились соответствующим образом, а в ходе фиксации и приготовления срезов не нарушилась морфология ткани и сохранились антигены. Процедура приготовления криостатных срезов описана в протоколе 2.2.

а. Замораживание и хранение образцов

Идеальными для получения криостатных срезов являются образцы ткани размером не более $10 \times 10 \times 5$ мм, маркированные и быстро замороженные в жидком азоте. Иногда для ускорения замораживания применяют изопентан, охлажденный в жидком азоте. Большинство лабораторий пренебрегают этим приемом, однако если есть опасность физической деформации ткани (например, мышечной), такая процедура может оказаться весьма полезной. Замороженные образцы следует хранить в жидком азоте или в морозильнике при -70°C , а во время приготовления срезов температура не должна превышать -20°C . Необходимо иметь в виду, что при длительном хранении образцов ткани при низкой температуре происходит их усыхание. На наш взгляд, замороженные ткани лучше всего держать в плотно закрытых пластиковых флаконах. Кусочек ткани помещают во флакон таким образом, чтобы его не пришлось размораживать перед приготовлением срезов, и заливают средой, обеспечивающей оптимальные условия разрезания при данной температуре (optimal cutting temperature, OCT, Miles Scientific, UK). Затем флакон маркируют, быстро замораживают и оставляют на хранение. Этот способ позволяет избежать отбора неоправданно больших образцов тканей и свести к минимуму их усыхание. По мере необходимости образцы вынимают из морозильника и сразу же помещают в криостат для приготовления срезов. Когда температура повысится до -20°C , кусочек ткани вместе с заливочной средой вынимают из флакона и закрепляют в держателе с соответствующей OCT. Чтобы не возникало проблем с выниманием ткани, лучше не пользоваться круглодонными флаконами с резьбой; оптимальными являются полиэтиленовые флаконы объемом 2,5 мл фирмы Kartell, UK. После приготовления срезов оставшийся кусочек ткани вновь помещают во флакон, заливают OCT и хранят в жидком азоте.

б. Приготовление срезов

Чаще всего работают со срезами толщиной 4–6 мкм. Приготовленные срезы помещают на стекло и высушивают на воздухе

при комнатной температуре не менее 30 мин, а при температуре 4 °С — до 24 ч. Если срезы не окрашены, то стекла заворачивают в алюминиевую фольгу попарно, срезами наружу, и помещают в холодильник. При -20 °С срезы можно хранить месяцы и даже годы. Когда понадобится проводить иммуноцитохимический анализ, стекла вынимают из холодильника, не разворачивая фольгу до тех пор, пока стекла не прогреются до комнатной температуры. Это позволяет избежать скапливания на стеклах конденсата, заметно изменяющего морфологию ткани.

Подобным способом с небольшими модификациями можно готовить замороженные срезы любых тканей. Иногда уменьшают время высушивания, чтобы сохранить особенно неустойчивые антигены.

Определенные трудности возникают при приготовлении срезов трепанобиоптатов костного мозга, которые применяют при исследовании лейкозов и других гематологических нарушений. Если костный мозг гиперклеточный, то образцы можно обрабатывать точно так же, как другие ткани, и резать обычным стальным ножом. Твердую костную ткань — если она присутствует в образце в большом количестве — лучше удалить, поскольку она не представляет интереса для анализа. Спикулы, пронизывающие костный мозг, обычно хорошо режутся, хотя и при более низкой температуре. Чтобы срезы получались более качественными, кусочки ткани следует ориентировать под прямым углом к режущей кромке ножа. Это особенно важно, когда для получения срезов хорошего качества требуется прочное их прилипание к стеклу и когда срезы делают острым лезвием бритвы. Использование агентов, удаляющих из тканей кальций, необязательно и может только ухудшить их антигенные свойства и морфологию. Разработанный метод удаления кальция [3] требует продолжительного времени и не очень удобен для диагностических исследований. Если не удастся получить удовлетворительные срезы, то лучше использовать для ИЦХ-анализа «столбики» трепанобиоптатов. Их готовят, как любые другие цитологические препараты (разд. 3.2), но, конечно, до замораживания трепанобиоптата.

Когда нужны более толстые замороженные срезы, можно использовать свободно плавающие срезы, сделанные на замораживающем микротоме. Окрашивание таких срезов улучшает их проницаемость для антител, но при этом может потребоваться дополнительная обработка срезов, например детергентами.

Не следует делать замороженные срезы, если имеются хоть какие-то подозрения на присутствие в ткани инфекционных аген-

тов. Таких агентов можно выявить окрашиванием фиксированных и заключенных в парафин тканей, и если они обнаружены, то необходимо провести дезинфекцию или вообще отказаться от приготовления срезов. При исследовании тканей больных, инфицированных ВИЧ или другими вирусами, образцы обрабатывают бета-проприолактоном [4], который инактивирует вирусы, не влияя на антигенные свойства ткани.

в. Фиксация

Как показывает наш опыт, наилучшим фиксатором замороженных срезов является абсолютный ацетон; фиксацию проводят при комнатной температуре или при 4 °С. Срезы погружают в ацетон на 10 мин, а затем высушивают на воздухе. Антитела или блокирующие вещества наносят непосредственно на сухой срез.

Для лучшего сохранения морфологии ткани и некоторых антигенов разработано несколько альтернативных способов с использованием смеси периодата натрия, лизина и параформальдегида [5, 6]. Ценность такой обработки состоит в том, что при этом можно транспортировать ткани до их фиксации [5].

Протокол 2.2. Приготовление замороженных срезов для иммуноцитохимического анализа

1. Делают криостатные срезы быстрозамороженных кусочков тканей толщиной 5 мкм и высушивают их на воздухе. Если в течение суток срезы не будут окрашены, заворачивают предметные стекла в фольгу, надписывают и хранят при -20 °С. По мере надобности вынимают стекла из холодильника, разворачивая фольгу только после того, как стекла прогреются до комнатной температуры.
 2. Указывают на стеклах названия антител, используемых для мечения.
 3. В течение 10 мин фиксируют срезы на стеклах в ацетоне при комнатной температуре.
 4. Высушивают стекла на воздухе. Антитела наносят прямо на сухой срез.
-

3.1.5. Парафиновые срезы

Как мы уже говорили, тканевые антигены могут утрачиваться на каждом этапе приготовления парафиновых срезов. И все же с помощью рутинных гистологических методов удастся выявить до-

статочно большое число антигенов, что позволяет решать многие важные диагностические проблемы. Чтобы добиться лучшего окрасивания препаратов, следует иметь в виду несколько моментов.

а. Фиксация

Наиболее удобными гистологическими фиксаторами, позволяющими сохранить морфологию ткани, являются растворы на основе формалина. К сожалению, они отрицательно влияют на сохранность антигенов, особенно при длительной фиксации, но пока какой-либо замены формалину при проведении рутинных гистологических исследований не найдено. Если есть возможность получать свежие образцы ткани, то лучше использовать фиксаторы, наиболее подходящие для ИЦХ, например периодат-лизин—параформальдегид (ПЛП) и ПЛП-бихромат [7, 8]. Однако это предполагает, что специалист по молекулярной диагностике заранее знает, какие именно исследования ему предстоит проводить, а это бывает нечасто.

Полагают, что одни антигены формалин разрушает полностью, число других при таком способе фиксации снижается незначительно, третьи маскируются. Один из способов расширения круга антигенов, поддающихся выявлению в фиксированных формалином и заключенных в парафин тканях, состоит в применении более чувствительного метода детекции, позволяющего обнаруживать даже незначительные количества антигенов. Другой подход заключается в обработке срезов протеолитическими ферментами до их иммуноокрасивания. Прежде чем рассматривать этот метод, стоит вкратце остановиться на механизме фиксации тканей формалином. В его основе лежит образование метиленовых мостиков между аминокруппами белков. Такое поперечное сшивание может маскировать те участки молекул, которые должны были бы связаться с антителами; именно для разрушения сшивок срезы и обрабатывают ферментами.

Обработка протеолитическими ферментами. Для этой цели используют несколько ферментов. Среди них:

- | | |
|---------------|----------------|
| • Трипсин | • Протеаза |
| • Пепсин | • Протеиназа К |
| • Проназа [9] | • Фицин [10] |

Выбор фермента зависит от:

- времени фиксации;
- характера фиксирующего агента;
- выявляемого антигена.

Ферментативная обработка необходима не всегда. Она неприемлема, если нужно выявить антигены, разрушающиеся при протеоллизе. В любом случае ее следует проводить с осторожностью, поскольку слишком длительная инкубация срезов с ферментом ухудшает качество окрашивания и изменяет морфологию ткани. Кроме того, для лучшей повторяемости результатов необходимо помнить следующее:

- нужно использовать свежеприготовленные растворы, а фермент добавлять в предварительно прогретый раствор;
- прежде чем наносить на предметные стекла раствор с ферментом, их необходимо прогреть до нужной температуры;
- для прогрева растворов и их хранения лучше использовать водяную баню, а не термостат.

Протокол 2.3. Обработка протеолитическими ферментами парафиновых срезов тканей, фиксированных формалином

Материалы

- Раствор трипсина: 0,1% (в/о) трипсин типа II (ICN Biochemicals 150213) в 0,1% CaCl_2 , pH 7,8 (pH доводят с помощью 0,1% NaOH или 2% HCl). Прежде чем добавлять трипсин, прогревают раствор CaCl_2 до 37 °C не менее 15 мин в водяной бане. Трипсин хранят при 4 °C
- Раствор протеазы: 0,0125% (в/о) бактериальная протеаза типа XXIV (Sigma P-8038) в буфере 50 mM трис-HCl, 100 mM NaCl, pH 7,6 (ТСБ) при 37 °C. Протеазу хранят в сухом виде при температуре ниже 0 °C. Прежде чем добавлять ее, буфер прогревают не менее 15 мин в водяной бане
- Раствор пепсина: 0,4% (в/о) пепсин (Sigma P-7012) в 0,01 M HCl, pH 2,0

Методика

1. Готовят по обычной методике гистологические срезы толщиной 4–5 мкм. Высушивают их при 37 °C в течение ночи или при 60 °C в течение 1 ч. Надписывают стекла, указывая наносимые на срезы антитела.
2. Удаляют парафин со срезов в трех сменах ксилола, по 2 мин в каждой смене.
3. Проводят срезы через батарею спиртов, 100%, 100%, 70%, по 2 мин в каждом.

4. Тщательно промывают срезы водопроводной водой, а затем споласкивают в дистиллированной воде.
 5. Прогревают срезы в дистиллированной воде при 37 °С в течение 5–10 мин.
 6. Стряхивают со стекол воду и помещают их в раствор трипсина, протеазы или пепсина.
 7. Останавливают ферментативную обработку, опустив стекла со срезами в дистиллированную воду, а затем в ТСБ. Антитела и блокирующий раствор следует наносить на влажные, а не на сухие срезы.
-

Продолжительность протеолитической обработки зависит от перечисленных выше факторов. Кроме того, иногда нужно учитывать и длительность фиксации ткани. Поэтому для каждого из антител необходимо проводить пробные обработки, с тем чтобы подобрать оптимальные условия протеолиза в тканях, приготовленных обычным способом. Если условия приготовления отличались от стандартных, требуются дополнительные предварительные исследования.

При фиксации тканей отличными от формалина фиксирующими агентами протеолиз может оказаться необязательным благодаря другому механизму фиксации. Более того, обработка ферментами может быть даже противопоказана. Так, при фиксации агентом Карнуа фермент полностью изменяет морфологию ткани. Поэтому при проведении молекулярно-диагностических тестов следует помечать кусочки тканей, не фиксированных формалином, особенно если предполагается провести ИЦХ-анализ.

б. Выбор блока ткани

Лучше всего окрашиваются свежefиксированные, маленькие или среднего размера кусочки (блоки) ткани. Кроме того, для их окраски требуется меньше реактивов. Когда имеется большой блок ткани, но предполагается исследовать лишь его часть или если ткань гомогенна, следует разрезать блок на несколько кусочков, удобных для работы.

в. Высушивание срезов

При высокой температуре или длительном нагревании антигены могут денатурировать. Обычно для высушивания при 37 °С достаточно 8–24 ч. Если требуется провести срочный анализ, можно

прогреть срезы при 60 °С в течение 15–60 мин. При выявлении особенно нестабильных антигенов высушивание лучше проводить при комнатной температуре.

г. Депарафинирование

Как и при всех способах окрашивания, очень важно полностью удалить со срезов парафин и соответствующие растворители. Если на срезах останутся следы парафина, то не все антитела смогут проникнуть в ткань и срез окрасится неравномерно. Парафин удаляют в трех сменах ксилола, по 2 мин в каждом. Если используются растворители на основе эфирных масел цитрусовых, то стекла выдерживают в них дольше. Перед тем как промыть срезы водой, их следует провести через три смены спиртов (100%, 100%, 70%), по 2 мин в каждой.

д. Хранение блоков тканей

Блоки, залитые в парафин, хорошо хранятся при комнатной температуре. На устойчивых к формалину антигенах такое хранение не сказывается или сказывается очень незначительно. Можно привести примеры целого ряда успешных исследований блоков ткани, зафиксированных 30 лет назад [13, 14] или хранящихся даже более 150 лет.

е. Декальцификация

Приготовление качественных срезов осложняется наличием в тканях, особенно в костной, солей кальция, которые желательно удалить после фиксации. Для этого имеется широкий выбор реактивов, различающихся по своей способности влиять на сохранность антигенов. Как правило, большинство антигенов сохраняется в присутствии хелатирующих веществ. Приемлема и непродолжительная обработка некоторыми кислотами [15, 16].

3.1.6. Альтернативные методы получения срезов

Разработан ряд методов получения срезов, позволяющих сохранить гистологические свойства тканей в такой же степени, как в фиксированном формалином материале, и их антигенный состав — как в криостатных срезах. Помимо методов, в которых используются альтернативные фиксаторы, представляет интерес метод лиофилизации.

а. Срезы, полученные из лиофилизованных блоков

Ткани замораживают, лиофилируют и заключают в парафин. Срезы таких блоков можно готовить так же, как срезы любого

парафинового блока. Поскольку фиксация и обработка растворителями не проводится, в заливной в парафин ткани сохраняется значительно больше антигенов и не изменяется морфология [17].

При резке таких парафиновых блоков требуется особая осторожность, поскольку ткани становятся хрупкими. Готовые срезы плавают в ванночке с водой (но не со спиртом) при температуре 25–28 °С. Срезы можно осторожно расправить на прогретом столике, а затем подсушить при температуре 37 °С.

Залитые в парафин блоки ткани можно хранить при комнатной температуре, однако в случае длительного хранения лучше держать их при температуре от –20 до 4 °С. Аналогично, если срезы не будут использованы сразу после высушивания, их хранят при –20 °С точно так же, как замороженные срезы.

б. Срезы, заключенные в смолу

Долгое время считалось, что для проведения ИЦХ нельзя использовать срезы тканей, заключенных в гликольметакрилат (ГМА). Однако оказалось, что при соответствующих модификациях этого метода в тканях сохраняется достаточно много антигенов. Результаты получаются лучше, если образцы обрабатывают при низкой температуре. Имеют значение также типы используемых фиксатора, смолы, катализаторов и пластификаторов [9, 18–21]. В связи с небольшой толщиной получающихся срезов лучше применять высокочувствительные методы детекции, а также обрабатывать срезы протеолитическими ферментами.

3.2. Мазки

Иммуноцитохимические методы — полезное подспорье для идентификации клеток крови и тканевых жидкостей, а также для исследования препаратов, полученных при тонкоигольной аспирационной биопсии (ТАБ).

3.2.1. Изготовление препаратов

Препараты для ИЦХ могут быть трёх типов: а) отпечатки; б) мазки, полученные подходящими цитологическими или гематологическими методами; в) препараты, полученные центрифугированием клеточных суспензий. Последний метод предпочтителен, когда в распоряжении исследователя имеются биологические жидкости с небольшим количеством клеток, жидкости, полученные методом ТАБ или содержащие много белка, который нужно

отмыть перед иммуноокрашиванием. Основные этапы приготовления препаратов для ИЦХ описаны в протоколах 2.4 и 2.5.

Протокол 2.4. Центрифугирование материала, полученного методом ТАБ¹⁾

1. Собирают материал, полученный при тонкоигольной аспирационной биопсии, в среду RPMI (Gibco, UK).
2. Центрифугируют при 600 g в течение 5 мин.
3. Удаляют супернатант и ресуспендируют осадок в 3 мл этой среды²⁾.
4. С помощью лабораторной центрифуги (например, cytopspin machine фирмы Shandon, UK) при скорости 550 об./мин наносят суспензию на предметные стекла (из 3 мкл суспензии получают 12 препаратов, по 250 мкл на препарат).
5. Высушивают стекла и, если не требуется срочного окрашивания, хранят их при -20°C завернутыми в алюминиевую фольгу.

¹⁾ Аналогичные процедуры, за исключением п. 1, можно использовать при работе с другими цитологическими жидкостями.

²⁾ Если в образце содержится много сывороточных белков, желательно промыть клетки еще раз, т. е. повторить пп. 2 и 3.

Когда концентрация клеток в образцах велика и особенно когда образуются агрегаты, затрудняющие приготовление мазков, заключают клеточный препарат в агар, фиксируют формалином, проводят через парафин и готовят срезы, как в случае парафиновых блоков. Иногда (аспираты костного мозга или препараты ТАБ) формируют из клеток «шарик», заключают его в ОСТ, замораживают и готовят криостатные срезы.

Заметим, что препараты из некротизированных тканей и препараты с большим содержанием эритроцитов или со следами мокроты, как правило, малопригодны для проведения иммуноцитохимического анализа.

3.2.2. Фиксация

Для исследования клеточных мазков с помощью ИЦХ используют следующие фиксаторы:

- | | |
|------------|---------------------------------------|
| • Ацетон | • Эфир/спирт |
| • Метанол | • Ацетон/фосфатно-солевой буфер (ФСБ) |
| • Этанол | • Ацетон/ФСБ/формалин |
| • Формалин | • Ацетон/цитратный буфер |

Тип реактива и продолжительность обработки зависят от природы исследуемых антигенов. Наш опыт показывает, что лучше остановиться на несложном универсальном методе с одинаковым режимом обработки всех цитологических препаратов. Мы фиксируем препараты в смеси ацетон : метанол (1 : 1, о/о) в течение 90 с или — для лучшего сохранения морфологии — в смеси ацетон : метанол : формалин (19 : 19 : 2, о/о). После фиксации предметные стекла промываем в двух сменах триса или ФСБ не менее 5 мин.

Не следует фиксировать влажные препараты, поскольку продолжительное воздействие спиртовых растворов может повлиять на антигенные свойства тканей.

Протокол 2.5. Изготовление цитологических препаратов для иммуноцитохимии

1. Высушенные на воздухе мазки или препараты, полученные центрифугированием клеточных суспензий, обрабатывают рутинным способом. Если их не предполагается окрасить в течение суток, стекла заворачивают в фольгу, надписывают и хранят при -20°C . По мере надобности вынимают стекла из холодильника, не разворачивая фольги, пока они не прогреются до комнатной температуры.
 2. Помечают на стеклах, какие антитела используются. С помощью алмазного маркера, стеклографа или специального иммуноцитохимического карандаша (Dako) обводят препарат в кружок.
 3. Фиксируют препараты в смеси ацетон : метанол (50 : 50) при комнатной температуре в течение 2 мин.
 4. Промывают стекла в ТСБ, рН 7,6, в течение 2 мин. Перед нанесением на препарат антител или блокирующей сыворотки удаляют излишки буфера.
-

4. Первые антитела

В распоряжении исследователей имеется богатый выбор антител к антигенам тканей человека. Многие из них уже давно используются для диагностики, другие лишь недавно охарактеризованы и только вводятся в практику. Заинтересованный читатель найдет многочисленные примеры их использования в работах [22, 23].

Выбор антител для целей диагностики зависит от того, какую именно патологию предполагается выявить. Другой важный кри-

терий — стоимость. Необходимо также учитывать специфичности и титр антитела, его сродство (аффинность) к антигену-мишени.

4.1. Проверка антител

Если вы только приступаете к работе с данным антителом, необходимо:

- а) определить специфичность антитела; для этого полезно использовать блоки замороженных или заключенных в парафин тканей [24–26];
- б) определить подходящую рабочую концентрацию (разведение) для используемой системы иммуномечения;
- в) выбрать режим фиксации и обработки ткани, включая протеолиз; лучше использовать фиксаторы, наиболее употребительные в данной лаборатории.

4.2. Хранение антител и работа с ними

К антителам, имеющимся в продаже, прилагается инструкция, в которой указаны условия их хранения, оптимальные для поддержания активности. Не обязательно хранить все антитела при 4 °С, некоторые из них лучше держать при –20 °С, разлив препарат после предварительного анализа свойств антител в подходящие емкости. С одной стороны, хранение при 4 °С может отрицательно сказаться на целостности антител, а с другой — повторное замораживание и оттаивание препарата приводит к еще более быстрому их разрушению.

5. Системы иммуномечения

Разрабатывая и совершенствуя системы иммуномечения, преследуют две цели: а) повышение чувствительности методов визуализации сайтов связывания антител с антигенами; б) создание более универсальных методов. Для этого можно использовать более легко обнаруживаемые метки или применять методику связывания с каждым антигеном большего количества метки.

5.1. Выбор системы иммуномечения

Наиболее простая процедура состоит в непосредственной конъюгации метки с антителом (или антителами) к данному антигену и нанесении конъюгата на срез в один прием *прямым* мето-

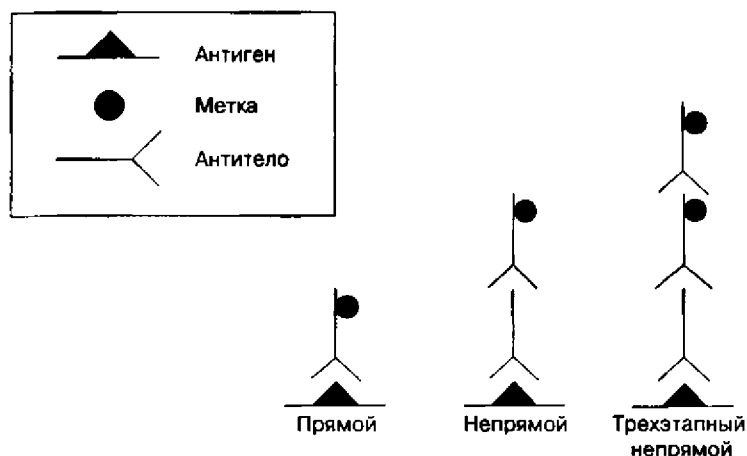


Рис. 2.1. Прямой и непрямой методы иммуномечения.

дом. Этот метод довольно прост, но не очень чувствителен; кроме того, при работе с данной антисывороткой можно использовать только один метод. Известен и другой, более совершенный *непрямой* метод. В этом случае тканевые срезы инкубируют с немечеными первыми антителами, а затем — со вторыми, мечеными антителами к видам — донорам первой антисыворотки. Такой метод позволяет использовать одно меченое антитело с большим числом первых антител при условии, что последние происходят от одного вида. Поскольку с первым антителом связывается целый ряд антител из второй антисыворотки, чувствительность метода возрастает. Чувствительность можно также повысить, используя третий компонент, меченое антитело к виду — донору второй антисыворотки. Это так называемый *трехэтапный*, или *усиленный непрямой метод* (рис. 2.1).

Разработаны и другие системы иммуномечения. Одни из них используются довольно часто, другие — только в исследовательских целях, но представляют несомненный интерес для молекулярной клинической диагностики.

5.1.1. Пероксидаза—антипероксидаза (ПАП) и щелочная фосфатаза—антищелочная фосфатаза (ЩФАЩФ)

В этих двух методах используется растворимый иммуноферментный комплекс, который образуется благодаря сродству ме-

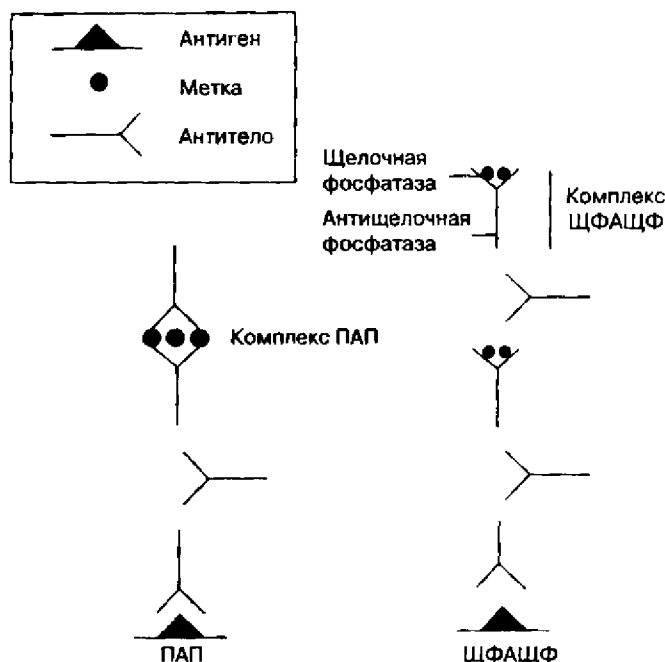


Рис. 2.2. Мечение с использованием пероксидазы—антипероксидазы и щелочной фосфатазы—антищелочной фосфатазы.

ченного фермента к «своему» антителу. Чтобы второе антитело (так называемое антитело-мостик) могло обеспечить связывание первого антитела с антителом комплекса, необходимо, чтобы последнее происходило от того же донора, что и первое. Антитела-мостики должны присутствовать в избытке, чтобы после их связывания с первыми антителами их второй Fab-участок оставался свободным для связывания с антителами комплекса (рис. 2.2).

Оба эти метода обладают такой же чувствительностью, как любой трехэтапный метод; их чувствительность можно повысить, вновь нанося второй и третий слои. Продолжительность этих инкубаций может быть меньшей, чем для первых стадий, а наслаивание антител можно проводить столько раз, сколько нужно для оптимального окрашивания. Пользуясь методом ЩФАЩФ, мы обычно проводим два цикла окрашивания, а для антигенов, присутствующих в ткани в малых количествах, — три или четыре цикла.

5.1.2. Авидин-биотиновые и стрептавидин-биотиновые системы

В основе этих методов лежит сродство авидина и стрептави-дина к небольшому белку биотину, четыре молекулы которого связываются с одной авидиновой (или стрептавидиновой) молекулой. Обычно эти системы применяются в ИЦХ одним из двух способов: на последнем этапе используется либо меченый авидин, либо комплекс между меченым биотином и авидином. В обоих случаях необходимы антитела-мостики к видам, от которых получены первые антитела, способные ковалентно связываться с биотином (рис. 2.3). Оба метода достаточно чувствительны и обычно в них используются меченые ферменты. Стрептавидиновый метод имеет то преимущество перед авидиновым, что изоэлектрическая точка стрептавида близка к нейтральной, а, следовательно, неспецифическое связывание стрептавида с заряженными группами в тканях практически отсутствует. Поскольку стрептави-

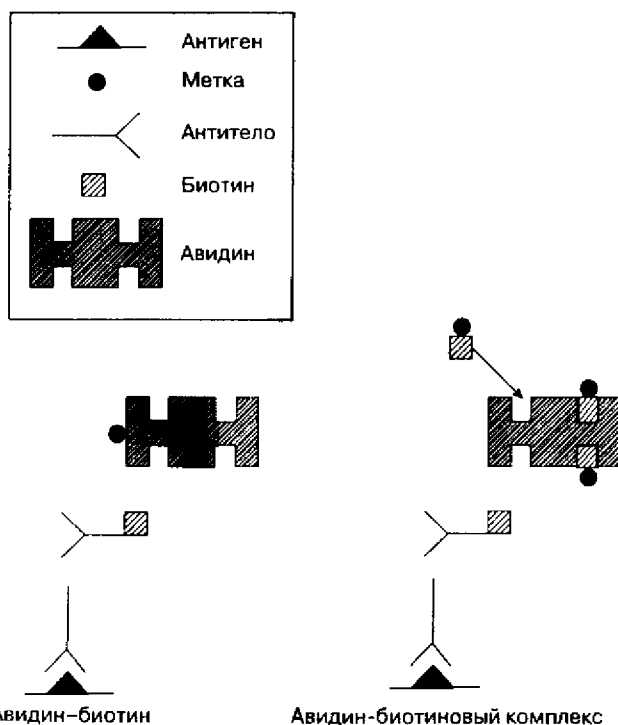


Рис. 2.3. Авидин-биотиновые системы.

дин — это белок, а не гликопротеин, он не связывается с тканевыми лектинами. Что касается авидина, то он связывается не только с эндогенными ферментами, но и с эндогенным биотином, что создает особенно серьезные проблемы при работе со срезами печени и почек, в первую очередь с замороженными, но не заключенными в парафин тканями. Такое связывание блокируют 20-минутной инкубацией срезов в 0,1% авидине и последующей 20-минутной инкубацией в 0,01% биотине [27]. Имеются сообщения и о неспецифическом связывании авидина с поверхностными антигенами гепатоцитов, инфицированных вирусом гепатита В [28].

5.2. Выбор метки

Метка необходима для визуализации места связывания антигена с антителом. В молекулярной клинической диагностике используется целый ряд меток; все они имеют как преимущества, так и недостатки (табл. 2.1). Три из них широко используются уже несколько лет, а четвертая стала применяться лишь недавно.

Таблица 2.1. Метки, использующиеся в иммуноцитохимии

Тип метки	Преимущества	Недостатки	Примеры
Флуоресцентный краситель	• Светочувствительность • Быстрота определения	• Необходим специальный микроскоп • Нестабильные препараты • Трудно провести корреляцию с морфологией ткани	• Флуоресцеинизотиоционат • Родамин • Фикоэритрин • Техасский красный • Диэтиламинкумарин (ДАМК)
Ферменты	• Стабильные препараты • Не нужен специальный микроскоп • Универсальность	• Наличие эндогенных ферментов	• Пероксидаза хрена • Щелочная фосфатаза • Глюкозооксидаза • β-Галактозидаза • Цитохромоксидаза
Металлы	• Высокая чувствительность	• Дорогие реактивы • Проблемы с усилением серебром	• Коллоидное золото
Металлопротеины	Используются в основном в электронной микроскопии		• Ферритин
Радиоизотопы	Используются в основном в научных исследованиях		• ^{131}I • ^{35}S • ^{32}P • ^{14}C

5.2.1. Флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ)

Флуоресцентные красители не нашли широкого применения в молекулярной клинической диагностике в основном из-за невозможности приготовления стабильных препаратов, необходимости использования флуоресцентного микроскопа и проблем с установлением корреляции между наблюдаемой картиной и морфологией. Однако благодаря своей чувствительности и простоте ФИТЦ-метод часто используют как в прямых, так и в непрямых системах детекции иммуноглобулинов, в частности при диагностировании буллезных поражений или гломерулонефропатий.

5.2.2. Пероксидаза хрена

При иммуномечении широко используются конъюгаты антител и других реагентов с пероксидазой хрена (ПХ). Сам по себе этот фермент невидим, но его легко визуализировать с помощью простых гистохимических процедур, в которых используются H_2O_2 в качестве субстрата и следующие колориметрические реактивы:

- 3,3'-диаминобензидин
- 3-амино-9-этилкарбазол
- 4-хлор-1-нафтол
- *п*-фенилендиаминпирокатехол
- тетраметилбензидин
- гомованиловая кислота
- нафтолпиронин

В присутствии диаминобензидина (ДАБ) образуется не растворимый в органических растворителях продукт. Это позволяет заключать препараты в синтетические среды и стабилизировать их, чем и объясняется популярность данного хромогена. Цвет конечного продукта реакции с ДАБ можно усилить или изменить с помощью различных солей тяжелых металлов. Такой способ повышает чувствительность метода и применяется при двойном мечении.

Усиливающие реактивы можно либо добавлять в раствор ДАБ, либо дополнительно обрабатывать ими препараты после инкубации с ДАБ [29–31]. Мы получали хорошие результаты, добавляя к раствору ДАБ/ H_2O_2 хлорид никеля ($NiCl_2 \cdot 6H_2O$) в концентрации 1 мг/мл.

Одна из проблем, возникающих при работе с ПХ, конъюгированной с антителами, состоит в том, что при этом визуализируется и эндогенный фермент тканей, например ПХ, содержащаяся в эритроцитах, полиморфноядерных лимфоцитах и макрофагах.

В большинстве случаев эндогенный фермент удается удалить, предварительно обработав препараты следующими реактивами:

- 3% пероксидом водорода в дистиллированной воде в течение 5–10 мин или 0,3–0,6% метанолом в течение 10–30 мин;
- подкисленным спиртом;
- 0,01% фенилгидразином в течение 30 мин;
- азидом натрия;
- цианидом натрия;
- феррицианидом калия;
- 1% нитроферрицианидом в метаноле;
- пикриновой кислотой.

Если необходима срочная окраска препаратов, то после протеолиза и перед окрашиванием с помощью иммунной метки мы обрабатываем препараты 3% H_2O_2 в течение 5 мин. Если позволяет время и окрашивается целая партия препаратов, то используется 30-минутная обработка 0,6% H_2O_2 в 80% метаноле. В обоих случаях для удаления из срезов следов эндогенной пероксидазы их можно повторно обработать блокирующими растворами.

Такие растворы могут неблагоприятно влиять на тканевые антигены, особенно в замороженных срезах и мазках. Чтобы избежать этого, уменьшают время инкубации с H_2O_2 или обрабатывают препараты пероксидом после инкубации их с первым антителом. Однако, как показывает наш опыт, ни один из этих способов не обеспечивает полной сохранности морфологии тканей. Часто эндогенный фермент обнаруживается в виде темно-коричневых гранул и его легко отличать от светло-коричневых пятен пероксидазы в системе иммуномечения, однако это не решает проблемы, когда исследуемые клетки содержат слишком много эндогенного фермента.

Можно попытаться использовать в качестве субстрата *n*-фенилендиаминпирокатехол (ФДП), поскольку он выявляет только ферменты растительного происхождения, в том числе пероксидазу хрена. Однако широкое использование этого реактива в качестве альтернативы ДАБ ограничивается нестабильностью его растворов.

Другой подход состоит в выявлении эндогенного фермента с помощью одного субстрата, а иммуномеченой пероксидазы — с помощью реактива другого цвета. Для рутинных измерений эта процедура слишком сложна, поэтому при большом содержании эндогенного фермента и невозможности его устранения лучше использовать альтернативное мечение.

Возможно, в будущем для пероксидазы будут использоваться и другие субстраты — либо в качестве альтернативы ДАБ, либо для двойного мечения. Несколько методов выявления ПХ приведены в протоколе 2.6.

Протокол 2.6. Выявление пероксидазы хрена

Метод 1. Диаминобензидин (ДАБ)¹⁾

1. Промывают срезы в двух сменах ТСБ, по 10 мин в каждой.
2. Растворяют 25 мг 3,3'-диаминобензидинтетрахлорида (ДАБ) в 50 мл ТСБ, pH 7,6. Непосредственно перед использованием этого раствора добавляют к нему 160 мкл 3% пероксида водорода (10 объемов), хорошо перемешивают и либо погружают предметные стекла в сосуд с раствором, либо отфильтровывают раствор на стекла, лежащие в инкубационном лотке²⁾.
3. Инкубируют препараты 3—5 мин при комнатной температуре.
4. Тщательно промывают стекла в проточной воде.
5. Окрашивают препараты гематоксилином, дифференцируют и промывают в проточной воде по Скотту до получения синей окраски.
6. Высушивают препараты и заключают срезы в иммерсионную среду DPX (Дерех). Пероксидаза выявляется в виде гранул коричневого цвета.

Метод 2. 3-амино-9-этилкарбазол (АЭК)

1. Промывают срезы в двух сменах ТСБ, по 10 мин в каждой.
2. Готовят два раствора для инкубации препаратов:

а) 3-амино-9-этиленкарбазол	10 мг
Диметилформамид	2,5 мл
б) H ₂ O ₂ (10 объемов)	0,2 мл
0,2 М ацетатный буфер, pH 5,0	50 мл

Смешивают эти два раствора и фильтруют на срезы. Инкубируют препараты до 20 мин при комнатной температуре.

3. Тщательно промывают в дистиллированной воде.
4. Слегка контрастируют водным раствором гематоксилина (например, фирмы Mayer), дифференцируют до получения синей окраски, но не в подкисленном спирте, поскольку он растворяет АЭК.
5. Пероксидаза выявляется под водной иммерсией в виде гранул кирпично-красного цвета.

Протокол 2.6 (Продолжение)

Метод 3. 4-хлор-1-нафтол

1. Промывают срезы в двух сменах ТСБ, по 10 мин в каждой.
2. Готовят раствор для инкубации препаратов:
 - а) растворяют 30 мг 4-хлор-1-нафтола в 0,25 мл абсолютного этанола;
 - б) добавляют 100 мл 0,05 М ТСБ, рН 7,6, к которому добавлено 50 мкл 30% H_2O_2 , и хорошо перемешивают;
 - в) перед использованием этот раствор фильтруют.
3. Инкубируют препараты до 20 мин при комнатной температуре (контролируя окрашивание под микроскопом).
4. Тщательно промывают препараты в дистиллированной воде.
5. При необходимости контрастируют препараты. Пероксидаза выявляется под водной иммерсией в виде гранул темно-синего цвета.

¹⁾ ДАБ получают от BDH (продукт под кодовым номером 13033). NB! Есть данные, что ДАБ обладает канцерогенными свойствами, поэтому при работе с ним нужно соблюдать меры предосторожности, например надевать маску и резиновые перчатки.

²⁾ Если окрашивание производится в сосуде Коплина или специальной емкости, то в одной смене раствора можно инкубировать две партии препаратов, а затем заменять раствор.

5.2.3. Щелочная фосфатаза (ЩФ)

Несмотря на то, что щелочная фосфатаза используется в иммуноцитохимии не так широко, как пероксидаза хрена, она занимает в иммуноцитохимических тестах важное место. На практике необязательно блокировать эндогенный фермент до инкубации препаратов с антисывороткой. Это можно сделать, добавив левамизол в концентрации 1–5 мМ прямо в среду, в которой растворен субстрат, поскольку кишечный фермент теленка, используемый в системе иммунодетекции, устойчив к действию левамизола. Однако в некоторых тканях, например в тканях пищеварительного тракта и плаценты, полностью блокировать активность эндогенного фермента бывает трудно. Когда не нужно проводить предварительную инкубацию, те антигены, которые могут разрушаться в процессе блокирования пероксидазы в замороженных срезах и мазках, легко обнаруживаются. Следует отметить, что растворы субстрата при работе со щелочной фосфатазой более сложные, чем в случае ДАБ, а окрашенные срезы нужно заключать в водную среду. Прекрасные и хорошо воспроизводимые результаты получаются с двумя растворами субстрата, приготовление которых

описано в протоколе 2.7. Раствор с новым фуксином/нафтол-AS-BI-фосфатом дает достаточно стабильную окраску, позволяющую заключать препараты в синтетическую среду, хотя при длительном хранении возможно их выцветание.

Протокол 2.7. Субстраты для выявления ЩФ

Метод 1

1. Растворяют в стеклянной пробирке 2 мг нафтол-AS-MX-фосфата (N-4875, Sigma) в 0,2 мл диметилформамида (ДМФ).
2. Добавляют к этому раствору 9,8 мл 0,1 М триса, pH 8,2.
3. Добавляют 10 мкл 1 М левамизола (L-9756, Sigma).
4. Непосредственно перед употреблением добавляют 10 мг быстрого красного TR™ (F-1500, Sigma), тщательно перемешивают и отфильтровывают на препараты¹⁾.

Метод 2

1. Готовят два раствора:

- а) в стеклянную пробирку с 0,5 мл свежеприготовленного 4% (в/о) нитрита натрия добавляют 0,2 мл 5% нового фуксина (CI 42520, R. Lamb) в 2М HCl, встряхивают 1 мин;
- б) в другой пробирке растворяют 50 мг нафтол-AS-BI-фосфата (N-2250, Sigma) в 0,6 мл ДМФ.

2. К 100 мл 0,05М трис-HCl, pH 8,4–8,7, добавляют реактивы в такой последовательности:

- 100 мкл 1М левамизола
- содержимое пробирки (а)
- содержимое пробирки (б)

3. Тщательно перемешивают и отфильтровывают прямо на препараты.

¹⁾ Для метода двойного мечения удобна синяя окраска препарата, поэтому заменяют быстрый красный TR на быстрый синий BV.

5.2.4. Золото

Частицы коллоидного золота стали использовать в качестве метки в иммуноцитохимии сравнительно недавно [32]. Метод, который вначале применялся преимущественно для приготовления электронно-микроскопических препаратов в сугубо научных целях (гл. 3), получил распространение в целом ряде диагностических лабораторий. В своем первоначальном варианте он не обла-

дал достаточной чувствительностью для визуализации тканевых антигенов. Чтобы увеличить чувствительность, срезы или клетки инкубировали в коллоидном растворе серебра, содержащем частицы меченого золота, которые служили центрами осаждения серебра. При таком способе окрашивания получается стабильный продукт черного цвета. Этот высокочувствительный метод можно рекомендовать для детекции антигенов в тканях, фиксированных формалином и заключенных в парафин, где антигены не выявляются с помощью иммуноферментных методов [33]. Чувствительность можно еще более повысить, используя световой поляризационный микроскоп [34]. Благодаря высокой интенсивности окрашивания этот метод можно сочетать с другими методами, например с окрашиванием трихромами, а также использовать в морфометрии с помощью автоматических анализаторов изображения. Он пригоден также для двойного мечения.

Несмотря на очевидные преимущества, метод с мечеными золотом, окрашенными серебром антителами не нашел пока широкого применения в молекулярной клинической диагностике. Дело в том, что это весьма капризная методика, необычайно чувствительная к температуре и времени экспозиции препаратов в усиливающем растворе. Кроме того, метод «не по карману» большинству лабораторий из-за дороговизны реактивов.

5.3. Выбор метода

Каждый из рассмотренных методов имеет свои преимущества и недостатки, так что никакого универсального метода, пригодного во всех случаях, не существует. В табл. 2.2 представлен ряд таких систем иммуномечения. Три наиболее часто используемых метода описаны в протоколах 2.8–2.10.

Протокол 2.8. Метод с использованием поликлональной кроличьей антисыворотки и конъюгированного с ПХ авидин-биотинового комплекса (ABC)¹⁾.

1. *Только для парафиновых срезов.* Блокируют эндогенную пероксидазу либо 0,6% H_2O_2 в 80% метаноле в течение 20 мин, либо 3% H_2O_2 в дистиллированной воде в течение 10 мин.
2. Тщательно промывают препараты сначала в проточной водопроводной воде, затем в дистиллированной воде и в ТСБ.
3. Инкубируют препараты 15 мин в 20% нормальной свиной сыворотке (НСС), растворенной в ТСБ.

4. Удаляют со стекол излишки буфера с сывороткой, наносят препарат первого антитела, разведенного в 20% НСС в ТСБ, инкубируют 30 мин.
5. Промывают препараты в двух сменах ТСБ, по 10 мин в каждой.
6. Удаляют излишки буфера, наносят связанные с биотином свиные антитела к кроличьему иммуноглобулину (например, Dako E353, UK), разведенные в ТСБ, и инкубируют препараты 30 мин.
7. Промывают препараты в двух сменах ТСБ, по 10 мин в каждой.
8. Удаляют излишки буфера, наносят на препараты конъюгат ПХ с АВС²⁾ (например, Dako K355) и инкубируют 30 мин.
9. Промывают препараты в двух сменах ТСБ, по 10 мин в каждой.
10. Инкубируют срезы 3–5 мин в $H_2O_2/0,05\%$ ДАБ в ТСБ (или в других субстратах) (см. протокол 2.6).
11. Тщательно промывают препараты в проточной воде.
12. Контрастируют препараты гематоксилином и при необходимости промывают их в проточной воде по Скотту до появления синей окраски.
13. Высушивают и заключают в среду DPX.

¹⁾ Чтобы использовать моноклональные антитела мыши, этот метод можно модифицировать следующим образом:

- а) в п. 3 берут нормальную кроличью сыворотку;
- б) в п. 4 антитела растворяют в кроличьей сыворотке;
- в) в п. 6 используют связанные с биотином кроличьи антитела к иммуноглобулину мыши.

²⁾ Комплекс ПХ-АВС нужно готовить не раньше, чем за 30 мин до использования; он сохраняет активность в течение 3 сут.

Таблица 2.2. Выбор системы иммуномечения

а. Биоптаты кожи и почек (выявление иммунных комплексов в замороженной ткани) метод [35]	Прямая ИМФ с ФИТЦ. В отсутствие замороженных срезов используют модифицированный иммуноферментный
б. Криостатные срезы	ЩФАЩФ
в. Клеточные мазки и т. д.	ЩФАЩФ
г. Парафиновые срезы	ПХ-АВС или в некоторых случаях — трех-этапная непрямая ИМФ или ЩФАЩФ

Протокол 2.9. ШФАЩФ-метод с использованием моноклональных антител мыши

В этом методе препараты дополнительно обрабатывают в соответствии с пп. 7–10. Для повышения чувствительности метода желательно повторить эти процедуры один или два раза.

1. Наносят на препараты первое антитело, растворенное в ТСБ, инкубируют при комнатной температуре 25 мин.
 2. Промывают по 5 мин в двух сменах ТСБ.
 3. Наносят на препараты кроличьи антитела к иммуноглобулину мыши (например, Dako Z259), разведенные в ТСБ, инкубируют 25 мин.
 4. Промывают 2 мин в ТСБ.
 5. Наносят на препараты комплекс ШФАЩФ, растворенный в ТСБ, инкубируют 25 мин.
 6. Промывают 2 мин в ТСБ.
 7. Наносят на препараты кроличьи антитела к иммуноглобулину мыши (п. 3), инкубируют 10 мин.
 8. Промывают 2 мин в ТСБ.
 9. Наносят на препараты комплекс ШФАЩФ (п. 5), инкубируют 10 мин.
 10. Промывают 2 мин в ТСБ.
 11. Инкубируют препараты 10–15 мин в свежеприготовленном растворе субстрата (см. протокол 2.7).
 12. Промывают препараты сначала в буфере, а затем в дистиллированной воде.
 13. Контрастируют препараты гематоксилином и при необходимости промывают их в проточной воде по Скотту до появления синей окраски.
 14. Закljučают препараты в водную среду.
-

Протокол 2.10. Непрямой трехэтапный иммунопероксидазный метод с использованием моноклональных первых антител мыши

1. *Только для парафиновых срезов.* Блокируют активность эндогенной пероксидазы 0,6% H_2O_2 в 80% метаноле в течение 20 мин либо 3% H_2O_2 в дистиллированной воде в течение 10 мин.
2. Тщательно промывают препараты сначала в проточной водопроводной, а затем в дистиллированной воде.
3. Промывают препараты в ТСБ, pH 7,6.

4. Удаляют со стекол излишки буфера и наносят первое антитело, разведенное в ТСБ, инкубируют 30 мин.
 5. Промывают препараты в трех сменах ТСБ, по 5 мин в каждой.
 6. Удаляют излишки буфера и наносят на препараты конъюгат ПХ с кроличьими антителами к иммуноглобулину мыши (например, Dako P260), инкубируют 30 мин.
 7. Промывают препараты в трех сменах ТСБ, по 5 мин в каждой.
 8. Удаляют излишки буфера и наносят на препараты конъюгат ПХ со свинными антителами к кроличьему иммуноглобулину (например, Dako P217), инкубируют 30 мин.
 9. Промывают препараты в трех сменах ТСБ, по 5 мин в каждой.
 10. Инкубируют срезы в растворе ДАБ/ H_2O_2 или в другом субстрате (см. протокол 2.6) до 5 мин.
 11. Тщательно промывают в проточной воде.
 12. Контрастируют гематоксилином и, если требуется, дифференцируют окраску.
 13. Обезживают препараты в батарее спиртов, затем в ксилоле и заключают их в DPX.
-

6. Контроли

Для каждого иммуноцитохимического теста необходимо провести параллельный контрольный эксперимент. Следует убедиться в том, что отрицательный результат обусловлен именно отсутствием конкретного антигена, а не методическими ошибками. Аналогично, положительный результат должен быть обусловлен специфическим связыванием антитела, а не какими-то другими причинами. Поэтому в контроле нуждаются реагенты, ткани и все процедуры.

6.1. Контроль реагентов

Антитела, имеющиеся сейчас в продаже, имеют гораздо большую специфичность, чем препараты, выпускавшиеся ранее, и качество антител, предназначенных для диагностических целей, проверяется еще в процессе их производства. Поэтому при работе с новым препаратом антител остается только подобрать его оптимальную рабочую концентрацию, а также выбрать режим протеолиза на фиксированных и заключенных в среду срезах. Кроме того, нужно проверить ткани на неспецифическое окрашивание, не выявляющее соответствующий антиген. Дополнительный кон-

троль абсорбции нужен только в том случае, если наблюдается перекрестное взаимодействие реагентов.

Если спустя какое-то время происходит снижение качества окрашивания данной партией препарата антитела, нужно еще раз проверить препарат, как это описано выше, и, возможно, подобрать новые условия работы с ним.

6.2. Контроль процедур

Такой контроль позволяет убедиться в правильности выполнения всех операций и в том, что реактивы не потеряли своей активности. Рассмотрим более подробно все аспекты этого контроля.

6.2.1. Тканевой контроль

Нужно убедиться, что используемое антитело сохраняет свою активность, поэтому каждый препарат первого антитела, используемый для окрашивания, проверяют на срезе ткани, заведомо содержащей интересующий нас антиген. Контрольный срез фиксируют и обрабатывают точно так же, как экспериментальный, и окрашивают его таким же способом, как исследуемые срезы. В случае положительного контроля используют ткани с низким или средним, но не с аномально высоким содержанием антигена. Это позволяет оценить чувствительность используемого метода. Если после окрашивания и тест, и контроль дают отрицательный результат, можно сделать вывод, что какие-то операции выполнены неправильно и необходима перепроверка (см. разд. 10). В некоторых случаях желательно провести отрицательный тканевой контроль, т. е. окрасить срез ткани, которая заведомо не содержит данного антигена, но обработана точно так же, как исследуемые срезы. Если контрольный срез окрашивается, то необходимо выяснить, почему. Обычно такой контроль не требуется, поскольку для достоверной оценки качества выбранных реактивов достаточно положительного контроля.

Для многих антигенов можно не проводить даже положительный тканевой контроль. Так, общий лейкоцитарный антиген, антиген, связанный с фактором VIII, виментин и другие антигены присутствуют во всех тканях и поэтому служат внутренним контролем для соответствующих им антител. Однако в тех лабораториях, где не окрашивают большие партии препаратов и антитела используются нерегулярно, положительный контроль необходим. Поддержанию высоких стандартов способствует постоянное участие лабораторий в Национальных программах гарантии качества.

6.2.2. Контроль первых антител

Активность первых антител можно контролировать, заменив их неиммунным реактивом при обработке параллельных (контрольных) срезов. Существует несколько вариантов такой замены:

- а) замена первыми антителами, которые были абсорбированы соответствующими очищенными антигенами;
- б) замена посторонними («нейтральными») антителами;
- в) замена неиммунной сывороткой, полученной от того же донора, что и первые антитела;
- г) первые антитела вообще не используют.

Первый вариант замены наиболее специфичен, но вследствие дороговизны очищенного антигена используется при рутинных исследованиях довольно редко. Второй вариант часто применяют в виде панели реактивов для диагностики. Третий и четвертый варианты при необходимости можно объединить. Для точности сравнения при выполнении операций (б) и (в) используют одинаковые концентрации иммуноглобулина и первого антитела.

6.2.3. Контроль других реагентов

На сегодняшний день контроль реагентов, использующихся на втором и третьем этапах ИЦХ-анализа, обычно не требуется. Если наблюдается неспецифическое окрашивание, не обусловленное качеством первых антител, то можно провести серию тестов с заменой неиммунными реагентами (разд. 10).

7. За лабораторным столом

Выбрав подходящий иммуноцитохимический метод и подготовив препараты, можно начинать иммуноокрашивание. Многие методические детали отдельных операций мы уже рассмотрели; поясним теперь ряд общих моментов.

7.1. Оборудование и реактивы

Широкому распространению иммуноцитохимических методов способствовало то важное обстоятельство, что необходимое для этого оборудование имеется в любой лаборатории. Если предполагается работать с замороженными и парафиновыми срезами, есть приспособление для изготовления парафиновых срезов и криостат, то понадобятся следующие реактивы и оборудование.

- Жидкий азот или морозильник на -70°C
- Морозильник на -20°C
- Холодильник на $+4^{\circ}\text{C}$
- Камера для инкубации препаратов
- Микропипетки от 5 мкл до 1 мл
- Сосуды для окрашивания, сосуды Коплина, подставки для предметных стекол
- Первые антитела и антитела для контроля
- Антисыворотка со вторыми и третьими антителами и соответствующие реактивы
- Нормальная (блокирующая) сыворотка
- Реактивы для приготовления буферов и растворов субстратов
- Красители для контрастирования срезов и среды для их заключения

7.2. Подготовка к окрашиванию

Прежде чем приступить к выполнению любого эксперимента, важно правильно организовать работу и предусмотреть все детали. Следует убедиться, что все антисыворотки, реактивы и оборудование имеются в наличии, а все препараты, включая контрольные, приготовлены и маркированы. Если срезы небольшие по площади, то полезно обвести их стеклогором, чтобы они были лучше видны на влажных стеклах. Препараты с нанесенными на них одинаковыми антителами при окрашивании в ванночке имеет смысл обрабатывать вместе. Следует сгруппировать по партиям и фиксированные формалином, заключенные в парафин препараты, одинаково обработанные протеолитическими ферментами.

7.3. Реагенты

В иммуноцитохимии не обращают внимания на правильность приготовления неиммунных реагентов. В то же время от свойств буферных растворов зависит ход иммунологических реакций. Буферы с неподходящим рН могут отрицательно повлиять на морфологию, особенно в цитологических мазках и замороженных срезах, которые фиксируются очень слабо, а также привести к отлипанию препаратов от предметного стекла. Как правило, нет необходимости каждый раз готовить свежий буферный раствор, но его следует правильно хранить. Старые маточные буферные растворы могут быть загрязнены грибами и другими микроорганизмами, которые проявятся на поверхности окрашиваемого среза.

7.4. Работа с препаратами

Убедитесь, что для окрашивания взято такое число стекол, с которым удобно работать. Новый метод лучше осваивать на небольшом числе препаратов и тщательно выполнять сами операции. В таком случае, если вас постигнет неудача, пропадет не слишком много реактивов и стекол. В дальнейшем для повышения эффективности работы можно обрабатывать большие партии препаратов. Несмотря на то, что время обработки каждого препарата тем или иным реактивом остается прежним независимо от числа окрашиваемых препаратов, время, необходимое для завершения всей процедуры иммуноокрашивания, с увеличением этого числа возрастает. Можно уменьшить число стекол, помещая на одно стекло два или три среза (в зависимости от их размера). Отдельные срезы лучше обвести восковым карандашом. Это полезно делать и тогда, когда на стекле находится только один срез: вы сможете наносить реактивы локально и сэкономите дорогостоящие антитела. Небольшие срезы удобно помещать на специальные планшеты с ячейками. Однако если парафиновые срезы предполагается обрабатывать протеолитическими ферментами, следует наносить на одно стекло только те срезы, для которых режим протеолиза одинаков. Промывание и инкубацию препаратов с протеолитическими ферментами, а также блокирующие процедуры можно проводить в сосудах Коплина или в других емкостях объемом 200 мл. При окрашивании больших партий горизонтально расположенных стекол иммунопероксидазным методом с использованием в качестве субстрата ДАБ/ H_2O_2 это позволит уменьшить преципитацию на срезах. Инкубацию препаратов с субстратами для щелочной фосфатазы можно проводить в специальных ванночках, но это довольно дорого. Лучше отфильтровывать небольшие объемы реактивов прямо на предметные стекла, лежащие в инкубационной камере.

Чтобы срезы не отлипали, все процедуры следует проводить с осторожностью. Промывая стекла, нельзя сильно встряхивать их и направлять струю буфера на срез. Не следует наносить реагенты на срезы или мазки каплями с помощью пипетки, лучше аккуратно насливать их.

Во время инкубации препаратов с антителами и другими компонентами системы иммуномечения стекла нужно помещать в закрытую камеру горизонтально. При нанесении на препараты иммунологических реагентов важно удалять со стекла излишки буфера, которые могут уменьшить титр антител и ослабить окраску, однако во время окрашивания срезы не должны высыхать.

С учетом всего этого на каждый препарат лучше наносить не более 50–100 мкл разведенной антисыворотки.

Если в одном и том же режиме регулярно окрашивают большие партии препаратов, то для экономии реактивов лучше иметь контейнеры с разведенной антисывороткой, куда погружают стекла в штативе. Мы с успехом применяли такой способ для окрашивания препаратов с помощью ЩФАЩФ, пользуясь одними и теми же партиями реактивов несколько месяцев. В промежутках между экспериментами контейнеры с растворами лучше хранить в холодильнике, добавив в них азид натрия для предотвращения роста микроорганизмов.

7.5. Специальные красители и красители для контрастирования

Контрастирование проводят для облегчения локализации антигенов в тканях. Чаще всего в качестве контрастирующего вещества применяют гематоксилин. В тех случаях, когда субстрат дает спирторастворимый продукт, следует использовать водный раствор гематоксилина, например гематоксилин Мейера. Если продукт имеет синюю окраску, можно использовать метиленовый зеленый или нейтральный красный, хотя они не очень эффективны для водной иммерсии.

Контрастирующие агенты, среди которых наиболее широко применяется синий Эванса, можно применять вместе с флуоресцентной меткой.

Иногда на одних и тех же срезах проводят гистохимические реакции или дополнительно окрашивают их более сложными красителями, например трихромами. Такие методы должны давать контрастную окраску по сравнению с иммуноокрашиванием; кроме того, их можно применять, только если последовательные процедуры не сказываются отрицательно одна на другой.

7.6. Проблема нехватки материала

Когда весь образец ткани израсходован или когда не осталось лишнего материала от проб, взятых для цитологических исследований, прибегают к одному из следующих приемов.

- а. Обесцвечивают имеющиеся препараты и окрашивают их заново. Результат повторного окрашивания зависит от природы выявляемого антигена, а также от характера предыдущей фиксации и схемы окрашивания. Несмотря на то, что некоторые устойчивые антигены, например цитокератины

и общий лейкоцитарный антиген, могут сохраниться, использование высокочувствительной системы иммунодетекции позволяет решить проблему.

- б. Фрагментируют имеющиеся препараты. На один срез или мазок можно нанести два или три разных антитела при условии, что те патологические изменения, которые интересуют исследователя, не локализованы в каком-то одном участке препарата. Стекло с препаратом разрезают на части с помощью алмазного стеклогrafa (хотя это может осложнить процедуры промывания и окрашивания). Можно разделить препарат на фрагменты с помощью специального иммунохимического воскового карандаша, ручки с флуоресцентными чернилами или аккуратной линией из расплавленного парафина. В каждом случае границу между фрагментами нужно предварительно осушить.
- в. Двойное/тройное мечение (разд. 9).

7.7. Совмещение иммуноцитохимического анализа с гибридизацией *in situ*

В некоторых случаях на одних и тех же срезах можно проводить и ИЦХ-анализ, и гибридизацию *in situ* ([36]; см. также гл. 4 и 7). Осуществимость такой комбинации зависит от влияния на исследуемые антигены тех процедур, которые применяются при гибридизации *in situ*. В настоящее время такое совмещение методов используется в целях молекулярной клинической диагностики довольно редко.

7.8. Автоматизация

Повторяемость операций, совершаемых при проведении иммуноцитохимических анализов, позволяет автоматизировать метод. Существуют как промышленные приборы для ИЦХ-анализа, так и лабораторные разработки [37, 38]. Выбор той или иной системы зависит от нескольких факторов:

- а) качество окраски (чувствительность, воспроизводимость результатов) должно быть не хуже, чем для анализа «вручную»;
- б) стоимость анализатора и соответствующих операций должна компенсироваться экономией времени и реактивов;
- в) анализатор должен быть достаточно универсален, чтобы его можно было использовать при различных модификациях метода;
- г) анализатор должен успешно справляться со всем объемом работ.

В каждой лаборатории эти моменты оцениваются самостоятельно. Но с увеличением объема работ и с появлением проблем, связанных с набором большого числа квалифицированных сотрудников, вопросы автоматизации становятся все более актуальными.

8. Улучшение качества иммуноокрашивания

Помимо использования новых антител и систем иммуноокрашивания, можно найти и другие способы улучшения качества окрашивания. При этом стремятся решить по меньшей мере одну из следующих задач:

- а) получить более интенсивную окраску;
- б) снизить стоимость метода, используя реактивы меньшей концентрации;
- в) уменьшить время выполнения операций.

Чтобы решить эти задачи, нужно тщательно выполнять все операции и обращать особое внимание на сохранность антигена и морфологии препарата. Для этого необходимо:

- выбрать подходящий протеолитический фермент и правильную методику работы с ним;
- подобрать оптимальный режим блокирования активности эндогенных ферментов;
- правильно разводить препарат антител;
- тщательно готовить растворы субстратов и усилителей.

8.1. Время инкубации

Увеличивая время инкубации препаратов с первыми антителами или со вторыми реагентами, можно значительно повысить интенсивность окраски. В большинстве случаев рекомендуется инкубировать препараты 30–60 мин, но увеличение этого времени вдвое может дать очень хороший эффект. Как правило, рекомендуемое время инкубации нужно рассматривать как минимальное, но не как оптимальное или предельное. Инкубацию с первыми антителами можно проводить в течение нескольких часов, а при слабом выявлении антигенов оставлять препараты в инкубационной камере на ночь (при 4 °С, чтобы уменьшить испарение). При продолжительной инкубации иногда происходит отлипание срезов и подсыхание препаратов. Чтобы избежать этого, стекла помещают в камеру при достаточно высокой влажности в горизонтальном положении.

8.2. Температура инкубации

В большинстве случаев инкубацию препаратов с антисывороткой проводят при комнатной температуре (20–22 °C). Для повышения качества окрашивания иногда иммунологические реагенты подогревают и проводят инкубацию при более высокой температуре. При этом следует быть уверенным, что не происходят денатурация антител, потеря антигенов и деструкция ткани. Мы получали хорошие результаты при температуре 37 °C, однако имеются данные об успешной инкубации при температурах вплоть до 60 °C. Для хорошей воспроизводимости результатов необходимо предварительно прогревать инкубационную камеру и реактивы. В последнее время для этого используют микроволновую печь, что позволяет уменьшить время инкубации с широким кругом антител до 30 с [39].

8.3. Титр

Результат окрашивания в значительной степени зависит от концентрации первых антител и других иммунологических реактивов. Используя более концентрированные растворы, можно усилить интенсивность окраски, однако следует помнить о том, что при этом может повыситься фон.

8.4. Встряхивание

Положительный эффект нагревания во время инкубации препаратов, по-видимому, обуславливается увеличением скорости хаотического движения молекул антител, что повышает вероятность связывания их с антигенами. Аналогичный результат могло бы дать и встряхивание препаратов во время инкубации. Когда стекла лежат в инкубационной камере горизонтально, сделать это довольно трудно. Встряхивание применяется в некоторых автоматизированных системах и в тех случаях, когда окрашивание проводится в контейнерах.

8.5. Уменьшение неспецифического окрашивания

Антитела могут неспецифически связываться с реагентами, присутствующими на срезах, или заряженными группами. Такие нежелательные взаимодействия блокируют с помощью белковых препаратов, например неиммунной сыворотки, бычьего сывороточного альбумина (БСА) или сыворотки плода коровы (СПК),

добавляя их к разведенным антителам или нанося на препараты до инкубации последних с антисывороткой.

Кроме того, неспецифическое окрашивание может возникать из-за присутствия в антисыворотке посторонних антител, которые можно удалить абсорбцией на измельченных или гомогенизированных экстрактах таких органов, как мозг или печень.

Антитела могут связываться и со свободными альдегидными группами. Такое неспецифическое связывание частично устраняют с помощью раствора боргидрида натрия.

8.6. Тканевые пигменты

В клетках, мазках или на тканевых срезах могут присутствовать пигменты, искажающие результаты ИЦХ. Иногда возникают проблемы, обусловленные осаждением на препаратах желчи, солей железа, липофусцина, углекислоты и меланина после обработки тканей фиксаторами на основе формалина или хлорида ртути.

8.6.1. Удаление пигмента

Основное требование, предъявляемое к методу удаления тканевых пигментов, состоит в том, что он не должен влиять на антигенные свойства ткани. Это сужает круг применимых методов, но некоторые пигменты все-таки удается удалить.

а. «Формалиновый» пигмент

В этом случае ткань обычно погружают в спиртовый раствор пикриновой кислоты на 10 мин, а затем промывают водой. Эту процедуру иногда проводят до иммуноокрашивания, хотя она может отрицательно сказаться на антигенных свойствах ткани. Удаление формалинового пигмента происходит и в процессе применения иммунопероксидазного метода блокирования эндогенной пероксидазы, при этом никаких дополнительных операций не требуется.

б. «Ртутный» пигмент

Этот пигмент удаляют либо до иммуноокрашивания, либо во время иммунопероксидазного окрашивания перед контрастированием препаратов. Для этого их погружают на 5 мин в спиртовый раствор иода, а затем обесцвечивают 5% тиосульфатом натрия.

в. Меланин

Отложения меланина можно удалить погружением препаратов на 5 мин в 0,25% перманганат калия с последующим их обесцвечиванием 2% щавелевой кислотой [40, 41]. Поскольку эта процеду-

ра может негативно повлиять на некоторые антигены, нужно проводить контрольное окрашивание ткани, заведомо позитивной по данному антигену. Кроме того, может ухудшаться сцепление срезов со стеклом, поэтому желательно использовать адгезивы.

8.6.2. Альтернативный субстрат

Большинство пигментов имеют темно-коричневый цвет и их легко спутать, например, с ДАБ. Поэтому в системах с ПХ лучше использовать другие субстраты или альтернативные метки, например щелочную фосфатазу.

8.6.3. Сравнение с отрицательным контролем

Пигменты выявляют на отрицательном контрольном срезе, полученном от того же блока ткани, что и анализируемые срезы. И хотя проведение такого контрольного эксперимента довольно трудоемко, оно позволяет различить пигмент и продукт иммуноцитохимической реакции.

8.6.4. Гистохимическое выявление пигмента

В некоторых случаях пигмент можно обнаружить с помощью гистохимического метода контрастного окрашивания пигмента.

На наш взгляд из всех перечисленных приемов наиболее приемлемо использование альтернативного субстрата.

8.7. Детергенты

Проницаемость тканей для антител повышается, если добавить в буферные растворы или в растворы, содержащие антитела, такие детергенты, как тритон-100 или твин-80 [42].

8.8. Срезы

Более качественное окрашивание наблюдается на тонких срезах, полученных от небольших, хорошо зафиксированных блоков.

8.9. Повторное наслаивание

Интенсивность окрашивания при использовании ПАП и ЩФАЩФ значительно повышается после повторной инкубации реагента-мостика с комплексом фермент—антитело. Было показано также [43], что качество окрашивания улучшается при повторном наслаивании первого антитела и повторной инкубации с ним препаратов после промывания их в буфере.

8.10. Комбинация методов

Помимо описанных выше физических методов, улучшающих качество окрашивания, для выявления одного антигена можно использовать разные системы иммуноокрашивания.

9. Двойное и тройное окрашивание

Два и более антигенов в одном мазке или срезе можно выявить несколькими способами.

9.1. Последовательное окрашивание

Срез или мазок окрашивают, чтобы выявить один из антигенов, и фотографируют. Затем до наслаивания второго антитела, связывающегося с другим антигеном, элюируют комплекс антиген—антитело или обесцвечивают субстрат с помощью перманганата калия.

9.2. Одновременное окрашивание

Наиболее эффективный вариант метода двойного окрашивания — выявление и визуализация двух и более антигенов одновременно. При этом используют два подхода:

- а) наслаивают на препарат одно антитело и используют систему детекции, выявляющую соответствующую метку, а затем проводят аналогичные операции со вторым антигеном;
- б) если используются антитела от разных видов, смешивают обе партии реагентов и проводят окрашивание в один прием.

При этом можно использовать

- две или три флуоресцентных метки, как правило, готовые конъюгаты антител [44];
- одну ферментную метку для выявления двух антигенов, каждый из которых визуализируют с помощью своего субстрата;
- две ферментные метки [45];
- комбинацию фермент—иммуноглобулины, меченные золотом, с усилением окраски серебром [46].

Важно, чтобы разные компоненты используемой системы не давали перекреста. Лучше всего, если антитела происходят от раз-

ных видов и компоненты двух систем иммуноокрашивания не реагируют между собой. Можно использовать и два первых антитела от одного и того же вида, но при этом следует иметь в виду, что на втором этапе реагент-мостик может связаться с любым первым антителом, не прореагировавшим на первом этапе, что даст ложноположительный результат.

Следует позаботиться и о выборе субстрата с тем, чтобы получить хороший контраст при окраске продуктов. В зависимости от исследуемых антигенов можно при необходимости разводить антитела так, чтобы окрашивание было сбалансированным, лишь бы одна реакция не маскировала другую.

Несмотря на то, что последовательное окрашивание требует больше времени, мы предпочитаем именно этот метод, используя две разные ферментные метки независимо от источника антител. При наличии адекватного контроля перекрестных реакций можно использовать первые антитела от одного вида.

10. Некоторые проблемы и способы их решения

В последнее время в иммуноцитохимии достигнуты значительные успехи. Улучшилось качество реактивов, а фирмы-производители стали давать подробные инструкции по их применению. Все это помогло решить некоторые проблемы, ранее возникавшие при проведении иммуноцитохимических анализов. Однако ряд проблем все-таки осталось, и связано это с

- плохой морфологией препаратов;
- плохим окрашиванием;
- наличием фонового окрашивания.

Эти проблемы суммированы в табл. 2.3.

10.1. Другие замечания

10.1.1. Фоновое окрашивание

При наличии интенсивного фона неизвестного происхождения нужно выяснить, на каком этапе он появился. В предположении, что дело не в плохой фиксации ткани или неправильном приготовлении препарата, причину можно установить методом исключений. Для этого готовят и окрашивают несколько срезов по следующей схеме.

№ препарата	1	2	3	4	5	6	7	8
Блокирующая сыворотка	+	0	+	+	+	+	0	+
Первое антитело	+	+	0	+	+	+	0	0
Второе антитело	+	+	+	0	+	+	0	0
Третий реагент	+	+	+	+	0	+	0	+
Субстрат	+	+	+	+	+	0	+	+

Несмотря на всю трудоемкость такого анализа, последовательное исключение компонентов обязательно приведет к установлению причины появления фона и позволит ее устранить.

Таблица 2.3. Проблемы, возникающие при проведении иммуноцитохимического анализа

А. Плохая морфология

Возможная причина

Неправильная молярность буфера

Загрязнение буферов, препаратов антител и других реактивов микроорганизмами

Неправильная фиксация, особенно замороженных срезов и мазков

Излишний протеолиз

Подсыхание срезов во время окрашивания

Плохие препараты клеток/тканей

Неоднократное замораживание и оттаивание тканей

Образование конденсата на замороженных срезах

Устранение

Возьмите новый буфер. Проверьте маточные растворы

Замените новыми.
Проверьте маточные растворы

Используйте свежий фиксатор и/или пересмотрите протокол

Пересмотрите операции. Проверьте правильность приготовления растворов и температуру инкубации

Герметизируйте камеру

Пересмотрите операции

Пересмотрите операции

Оставьте препараты в фольге, пока они не прогреются до комнатной температуры

Б. Слабое окрашивание или отсутствие окраски

Возможная причина

Первые антитела не подходят для данных препаратов

Неправильная фиксация

Устранение

Проверьте срок хранения антител, прочтите прилагаемую инструкцию

Проверьте срок хранения реактивов, прочтите инструкции.
Пересмотрите протокол

Таблица 2.3 (Продолжение)

<i>Возможная причина</i>	<i>Устранение</i>
Слишком продолжительная фиксация	Время фиксации формалином не должно превышать 48 ч. Для некоторых антигенов предпочтительна менее длительная фиксация. Может оказаться полезным протеолиз
Замороженные срезы или клеточные препараты хранились слишком долго или при неподходящей температуре	Проверьте соответствующие процедуры
Неправильные условия протеолиза	Подберите подходящий фермент. При необходимости измените условия. Убедитесь, что используемый фермент активен и вы работаете в оптимальном режиме
Неправильное разведение первого антитела	В инструкции к препарату даются ориентировочные величины. Следует подобрать оптимальные условия
Антитела не нанесены на срез	Возможно, предметное стекло было перевернуто
Первые антитела, связывающиеся с антигенами в биологических жидкостях, такие как БСА, используются в качестве блокирующих агентов	Исключите такую возможность
Неподходящее второе антитело	Прочитайте надпись на упаковке
Неправильно разведены 2/3-антитела; 2/3-антитела не работают	Проверьте их с другими первыми антителами
Неправильно приготовлены субстраты для ферментов	Проверьте, достаточно ли взятого пероксида для работы с ПХ. Раствор должен быть свежеприготовленным. Убедитесь, что взятого количества соли нафтола достаточно для работы с ЩФ. Смешайте в пробирке конъюгированные антитела с субстратом. Если цвет раствора изменился, конъюгация произошла. Проверьте буферные растворы
Неподходящая заливочная среда	При работе с ЩФ может потребоваться водная заливочная среда
Неправильные pH или ионность буфера	Проверьте работу pH-метра и состав буфера
Неправильные длины волн при работе с флуоресцентными метками	Например, для ФИТЦ: 440–490 нм — длина волны возбуждающего света, 520–560 нм — длина волны испускаемого света

Таблица 2.3 (Продолжение)

<i>Возможная причина</i>	<i>Устранение</i>
Присутствие ингибиторов в дистиллированной воде	Используйте стеклянные дистилляторы
Буферы содержат азиды	Азиды инактивируют ПХ
Грязное оборудование	Пользуйтесь чистым оборудованием
Неправильное хранение антител	Не храните антитела разведенными. Не замораживайте конъюгированные антитела или комплексы. Убедитесь, что емкости для хранения плотно закрываются. Лучше использовать емкости с крышкой на резьбе
В. Слишком сильное окрашивание и/или высокий фон	
<i>Возможная причина</i>	<i>Устранение</i>
Присутствие эндогенного фермента	Убедитесь, что использована подходящая блокирующая процедура
Слишком велика концентрация антител	Уменьшите концентрацию
Перекрестная реакция 2-го и 3-го анти-тел с иммуноглобулином человека	Абсорбируйте иммуноглобулин нормальной сывороткой, взятой у реактивного вида
Связывание эндогенного авидина	Используйте блокирующие процедуры.
Слишком длительная инкубация с субстратом	Уменьшите время инкубации
Неправильно приготовленный субстрат	Проверьте способ приготовления
Неправильное промывание препаратов во время окрашивания	Берите стекла по отдельности и помещайте их в буфер не менее чем на 5 мин
Использована неподходящая блокирующая сыворотка	Используйте блокирующую сыворотку полученную от того же вида, что и вторые антитела
Неправильная фиксация	Пересмотрите протокол
Низкая концентрация соли в буфере для разведения антител	Используйте NaCl в концентрации не менее 0,15M
Подсыхание срезов во время окрашивания	Герметизируйте камеру
Антитела попадают между срезами	Перед тем как поместить стекла в стакан для промывания, промойте их по отдельности. Убедитесь в правильном расположении препаратов во время инкубации

10.1.2. Отрицательный результат

Если оказывается, что антитела (в частности, моноклональные), выбранные для работы с препаратами фиксированной и заключенной в парафин ткани, на самом деле не дают желаемого результата, а все другие компоненты системы вполне эффективны, можно предположить следующую схему. Сначала нужно проверить, сохраняется ли данный антиген в условиях фиксации и обработки ткани. Следует обратить внимание на обработку протеолитическими ферментами. Если окраска по-прежнему неудовлетворительная, проверяют препарат антитела на срезах, фиксированных ацетоном, или на замороженных срезах. При отрицательном результате пробуют применить другую систему иммуномечения, проверяют условия хранения и срок годности антител, в конце концов обращаются на фирму, поставляющую препараты. Если результаты проверки антител на замороженных срезах положительные, то проверяют их на парафиновых срезах. В случае положительной реакции можно думать, что в исходном блоке ткани нет искомого антигена. Отрицательный результат при исследовании нового блока этой ткани указывает на неправильную фиксацию или обработку препаратов. В таком случае для выявления антигена необходимо изменить протокол. Когда метод отлажен, а положительный и отрицательный контроли дают ожидаемые результаты, но исход опыта отрицателен, можно предположить, что

- в ткани вообще нет антигена;
- содержание антигена настолько мало, что его нельзя обнаружить с помощью данного метода, а следовательно, нужно использовать более чувствительный метод;
- ткань перефиксирована или неправильно обработана и порезана. Это легко проверить, убедившись, что положительный контроль идентичен по своим характеристикам исследуемой ткани. В нашей лаборатории хранится серия блоков тканей (например, миндалин, кишечника), которые были фиксированы в течение разного времени в различных фиксаторах и могут использоваться как контроли в тех случаях, когда режим фиксации заведомо отличается от обычного.

Следует отметить, что большинство проблем, перечисленных в табл. 2.3, возникают по вине экспериментатора. Это подтверждает общее правило, что прежде чем использовать новый метод, нужно освоить все его этапы в полном соответствии с протоколом, а прежде чем применять новую партию антител или систему детекции, нужно ознакомиться с их характеристиками. Необходи-

мо прочитать описание реактивов в прилагаемой инструкции, а также имеющие отношение к делу публикации. Если, судя по литературным данным, какие-то антитела используют только при работе с замороженными срезами, не стоит удивляться, что они не дают удовлетворительных результатов в случае фиксированных парафиновых срезов.

Литература

1. Huang W. M., Gibson S. J., Facer P., Gu J., Polak J. M. (1983). *Histochemistry*, **77**, 27.
2. Maddox P. H., Jenkins D. (1987). *J. Clin. Pathol.*, **40**, 1256.
3. Mori S., Sawai T., Teshima T., Kyogoku M. (1988). *J. Histochem. Cytochem.*, **36**, 111.
4. Chaplin A. J., Heryet A., Holdsworth L. N., Eglin R. P., Millard P. R. (1989). *J. Clin. Pathol.*, **42**, 318.
5. Muramoto L. M., Kadin M. E. (1987). *Am. J. Clin. Pathol.*, **88**, 589.
6. Hall P. A., Stearn P. M., Butler M. G., D'Ardenne A. J. (1987). *Histopathology*, **11**, 93.
7. Collings L. A., Poulter L. W., Janossy G. (1984). *J. Immunol. Methods*, **75**, 227.
8. Brenes F., Harris S., Paz M. O. A., Petrovic L. M., Scheuer P. J. (1986). *J. Clin. Pathol.*, **39**, 459.
9. Islam A., Archimbaud E., Henderson E. S., Han T. (1988). *J. Clin. Pathol.*, **41**, 892.
10. Niehans G. A., Manivel J. C., Copland G. T., Scheithauer B. W., Wick M. R. (1988). *Cancer*, **62**, 1113.
11. Leong A. S.-Y., Daymon M. E., Milios J. (1985). *J. Pathol.*, **146**, 313.
12. Moran R. A., Nelson F., Jagirdar J., Paronetto F. (1988). *Stain Technology*, **63**, 263.
13. Hales S. A., Gatter K. C., Heryet A., Mason D. Y. (1989). *Leukaemia and Lymphoma*, **1**, 59.
14. Brown D. C., Heryet A., Gatter K. C., Mason D. Y. (1989). *Histopathology*, **14**, 621.
15. Mullink H., Henzen-Logmans S. C., Tadema T. M., Mol J. J., Meijer C. J. L. M. (1985). *J. Histochem. Cytochem.*, **33**, 1103.
16. Athanasou N. A., Quinn J., Heryet A., Woods C. G., McGee J. O'D. (1987). *J. Clin. Pathol.*, **40**, 874.
17. Stein H., Gatter K., Asbahr H., Mason D. Y. (1985). *Lab. Invest.*, **52**, 676.
18. Casey T. T., Cousar J. B., Collins R. D. (1988). *Am. J. Pathol.*, **131**, 183.
19. Van Goor H., Harms G., Gerrits P. O., Kroese F. G. M., Poppema A., Grond J. (1988). *J. Histochem. Cytochem.*, **36**, 115.
20. Glezerov V., Dorsett B. (1989). *Stain Technology*, **64**, 105.
21. Ojeda J. L., Ros M. A., Kardo J. M. (1989). *Stain Technology*, **64**, 243.
22. Gatter K. C., Mason D. Y., Heyderman E., Isaacson P. G. (1987). *Histopathology*, **11**, 661.
23. Mason D. Y., Gatter K. C. (1987). *J. Clin. Pathol.*, **40**, 1042.
24. Battifora H. (1986). *Lab. Invest.*, **55**, 244.
25. Wan W.-H., Fortuna M. B., Furmanski P. (1987). *J. Immunol. Methods*, **103**, 121.
26. Rowden G., Fraser R. B. (1988). *Stain Technology*, **63**, 49.
27. Wood G. S., Warnke R. (1981). *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 1196.
28. Van Den Oord J. J., Facchetti F., De Wolf-Peeters C., Desmet V. J. (1989). *J. Histochem. Cytochem.*, **37**, 551.

29. Gallyas F., Gorcs T., Merckenthaler J. (1982). *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 183.
30. Hsu C-M., Soban E. (1982). *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 1079.
31. Green M. A., Sviland M., Malcolm A. J., Pearson A. D. J. (1989). *J. Clin. Pathol.*, **42**, 875.
32. Holgate C. S., Jacson P., Cowen P. N., Bird C. C. (1983). *J. Histochem. Cytochem.*, **31**, 938.
33. Holgate C. S., Jacson P., Pollard K., Lunny D., Bird C. C. (1986). *J. Pathol.*, **149**, 293.
34. Ellis I. O., Bell J., Bancroft J. D. (1989). *J. Pathol.*, **159**, 13.
35. Sinclair R. A., Burns J., Dunnill M. S. (1981). *J. Clin. Pathol.*, **34**, 859.
36. Graham A. K., Herrington C. S., McGee J. O'D. (1991). *J. Clin. Pathol.*, **44**, 96.
37. Stross W. P., Jones M., Mason D. Y. (1989). *J. Clin. Pathol.*, **42**, 106.
38. MaWhinney W. H. B., Warford A., Rae M. J. L., Lauder I. (1990). *J. Clin. Pathol.*, **43**, 591.
39. Leong A. S-Y., Milios J. (1986). *J. Pathol.*, **148**, 183.
40. Alexander R. A., Hiscott P. S., Hart R. L., Grierson I. (1986). *Med. Lab. Sci.*, **43**, 1217.
41. McGovern J., Crocker J. (1987). *Am. J. Clin. Pathol.*, **88**, 480.
42. Herbert D. C., Weaker F. J., Sheridan P. J. (1982). *J. Histochem.*, **14**, 161.
43. Linsenmayer T. F., Fitch J. M., Schmidt T. M. (1988). *J. Histochem. Cytochem.*, **36**, 10758.
44. Staines W. A., Meister B., Melander T., Nagy J., Hokfelt T. (1988). *J. Histochem. Cytochem.*, **36**, 145.
45. Wagner L., Worman C. P. (1988). *Stain Technology*, **63**, 129.
46. Gillitzer R., Berger R., Moll H. (1990). *J. Histochem. Cytochem.*, **38**, 307.

ИММУНОЦИТОХИМИЯ: ЭЛЕКТРОННАЯ МИКРОСКОПИЯ

*Сузан Ван Норден, Энни Е. Бишоп,
Катрин М. Тимсон, Джулия М. Полак*

1. Введение

В этой главе мы рассмотрим методы изготовления иммуноцитохимических препаратов для электронной микроскопии на примере нейроэндокринной системы (НЭС).

НЭС — это рассеянный по всему организму комплекс, состоящий из клеток разного типа: эндокринных, паракринных, нервных, нейроэндокринных, которые продуцируют регуляторные факторы — пептиды и амины. Сюда относятся эндокринные клетки кишечника и поджелудочной железы, автономной нервной системы и эндокринных желез, например гипофиза. Электронная микроскопия уже давно играет главную роль в идентификации компонентов НЭС. Первые попытки классификации эндокринных клеток основывались в значительной мере на анализе ультраструктуры различных типов содержащихся в них секреторных гранул [1]. Позже появились дополнительные данные, полученные с помощью гистохимических методов, в частности с помощью методов импрегнации серебром, позволяющих различать аргирофильные и аргентаффиновые (серотонинсодержащие) гранулы [2]. Применение световой микроскопии в иммуноцитохимии привело к созданию новых методов исследования НЭС. Сравнивая фотографии иммуноокрашенных полутонких срезов, полученные с помощью светового микроскопа, с электронно-микроскопическими photographиями соответствующих серийных ультратонких контрастированных срезов (метод полутонких/тонких срезов), удалось исследовать ультраструктуру клеток эндокринных тканей [3]. Этот трудоемкий сравнительный метод позже уступил место электронно-микроскопической иммуноцитохимии.

Одной из первых иммунологических меток, используемых в электронной микроскопии вслед за световой, была пероксидаза. При этом для получения электроноплотного продукта, пероксидазы—диаминобензидина, использовали тетроксид осмия. Сейчас этот и другие сходные методы уступают место методам с использованием соединений, меченных коллоидным золотом, кото-

рые имеют ряд преимуществ (см. ниже). В частности, можно получать частицы золота разного размера, что позволяет проводить на одном срезе несколько иммунологических реакций и идентифицировать их продукты даже в одной секреторной грануле. Поскольку клетки НЭС часто продуцируют несколько пептидов, такое множественное иммуномечение оказалось очень полезным [4], например при исследовании посттрансляционного процессинга пептидов [5].

Электронно-микроскопическая иммуноцитохимия не только позволяет получать ценную информацию о НЭС в норме, но и диагностировать многие патологии. Диагноз этих патологий, в частности новообразований, затруднен, поскольку картина злокачественного роста клеток не имеет четких характеристик, так что обычные гистологические методы часто оказываются неприменимыми. Нейроэндокринные новообразования могут секретировать огромные количества пептидов и аминов или, напротив, не секретировать их вообще; в обоих случаях содержание антигенов в них слишком мало, чтобы их можно было выявить с помощью светового микроскопирования иммуноокрашенных препаратов. Кроме того, может быть недостаточным количество ткани для анализа, например, если биоптат получен с помощью шприца или представляет собой отпечаток. В таких случаях более результативной является электронная микроскопия.

Аномальные клетки могут содержать секреторные гранулы с нарушенной ультраструктурой, и их выявление указывает на изменение иммунореактивности клеток. Таким образом, электронно-микроскопическая иммуноцитохимия может не только служить полезным дополнением к световой, но иногда является единственным способом идентификации аномальных клеток (рис. 3.1).

Используя методы электронно-микроскопической иммуноцитохимии в клинической диагностике, нужно иметь в виду, что в аномальных клетках вследствие нарушения путей биосинтеза часто синтезируются модифицированные пептиды. Поэтому для однозначной идентификации клеток того или иного типа и вырабатываемых ими продуктов необходим набор специфических антител, узнающих различные производные пептидных предшественников.

Эта глава может служить практическим руководством для тех исследователей, кто намерен использовать электронно-микроскопическую иммуноцитохимию для изучения биологии НЭС и выявления различных ее патологий.

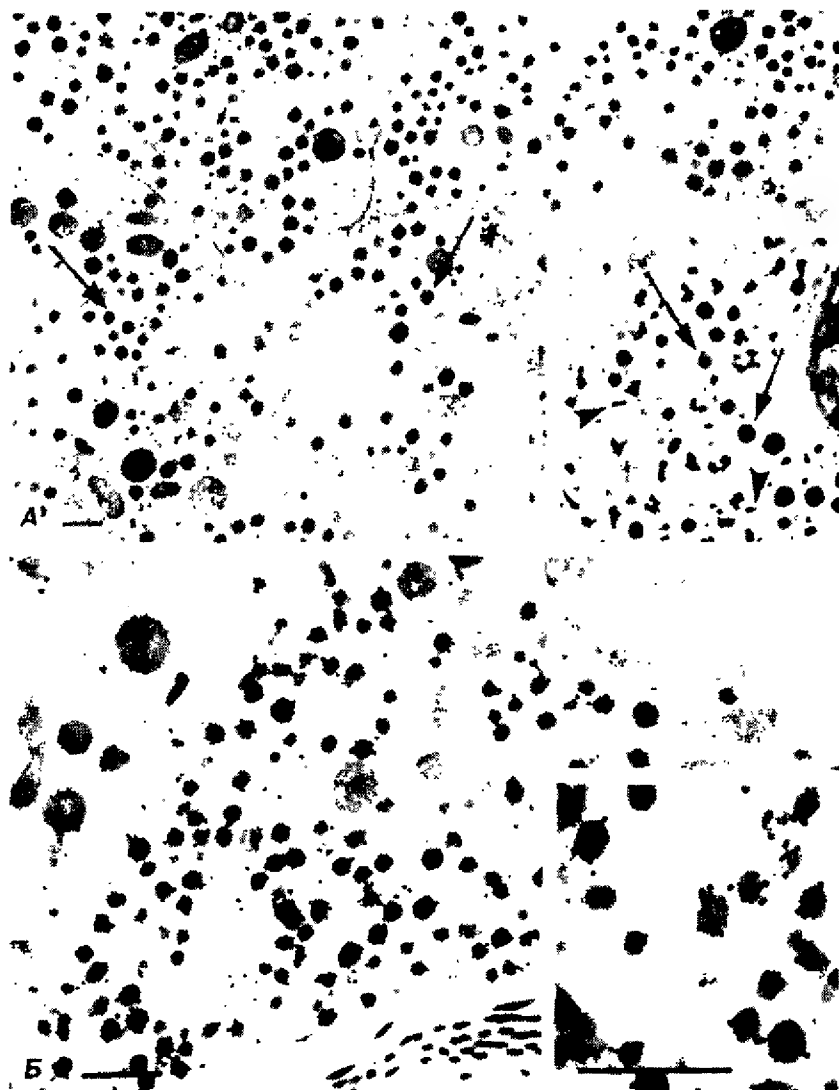


Рис. 3.1. А. Клетки опухоли поджелудочной железы, взятые от больного гиперинсулинемией. Фиксацию проводили 1% глутаральдегидом : 2% параформальдегидом, затем тетроксидом осмия. Секреторные гранулы (стрелки) напоминают незрелые инсулиновые гранулы (врезка), но меньше по размеру. На врезке — часть нормальной клетки, секретирующей инсулин. Фиксацию проводили 2,5% глутаральдегидом, затем тетроксидом осмия. Видны зрелые гранулы с кристаллическими ядрами (короткие стрелки) и незрелые гранулы (длинные стрелки).

2. Практические аспекты

Обычно при исследовании головного мозга и нервной системы с помощью иммунопероксидазного метода препараты предварительно заключают в соответствующую среду. Однако при электронно-микроскопическом исследовании НЭС такое заключение практически не применяют, потому, в частности, что молекулы антитела, адсорбировавшие частицы золота, слишком велики, чтобы проникнуть в глубь ткани, даже когда эта ткань фиксирована и проницаема для антитела. На монослои клеток в культуре можно наносить иммунную метку до их заключения в среду, но предварительное заключение гораздо удобнее.

Возможно, иммуноцитохимию с предварительным заключением в среду можно будет использовать для выявления рецепторов на клеточной поверхности, идентифицируя лиганды, связанные с рецепторами, с помощью меченых антител. Однако пока такой метод не применяется как рутинный в целях клинической диагностики. Полезной здесь может оказаться сканирующая электронная микроскопия.

Несмотря на то, что заключению препаратов в среду должна предшествовать их фиксация, уменьшающая иммунореактивность пептидов, такие методы могут иметь ряд преимуществ. По-разному фиксируя соседние срезы, приготовленные из одного блока (таких срезов может быть несколько сотен), можно подобрать оптимальные условия для каждого антитела и пометить самые разные антигены.

Частицы коллоидного золота, связанные с пероксидазной меткой, обладают высокой электронной плотностью и благодаря своей дискретности не затевают лежащие ниже структуры, маркированные антителом. Они могут быть разного размера, что облегчает двойное мечение. Кроме того, меченные золотом реагенты весьма стабильны [6].

В данной главе описаны методы работы с ультратонкими срезами, приготовленными из блоков ткани, заключенных в смолу;

Б. Клетки этой же опухоли, не фиксированные осмием. Иммуноокрашивание проводили с помощью кроличьих антител к пептиду С (1:8000, 4 °С, в течение ночи) и последующей конъюгации белка А с частицами коллоидного золота диаметром 20 нм. Окрашивание инсулиновых гранул указывает на синтез ими инсулина. На врезке — увеличенное изображение секреторных гранул, меченных коллоидным золотом. Все срезы контрастировали цитратом свинца и уранилацетатом. Длина отрезка соответствует 0,5 мкм.

срезы просматривали под трансмиссионным электронным микроскопом. Мы постоянно используем эти методы в нашей лаборатории, но ими не исчерпывается весь перечень доступных методов, описанных в литературе [6–7].

2.1. Приготовление образцов

2.1.1. Нормальные ткани

Обычно экспериментатор знает, где локализована интересующая его структура и как нужно ориентировать блоки, готовя срезы для электронной микроскопии.

2.1.2. Опухоли

Опухоли НЭС могут сильно различаться по структуре и функциональной активности. Даже в пределах одного и того же образца наблюдается неоднородное распределение типов клеток, отмечается разная секреторная активность, имеются области некроза и фиброза. Наиболее удобные для электронной микроскопии маленькие блоки (1 мм³) должны отражать морфологию опухоли. Оптимальные результаты получаются при немедленной фиксации таких блоков (разд. 2.2). Для этого используют разнообразные фиксаторы, обеспечивающие сохранность ультраструктуры ткани.

2.1.3. Препараты, полученные при тонкоигольной аспирационной биопсии

Учитывая все сказанное выше, приходится отметить, что иммуноцитохимия аспиратов опухолевых клеток в случае как световой, так и электронной микроскопии не очень информативна с диагностической точки зрения и подвержена влиянию многих случайных факторов. Впрочем, при нехватке ткани такие ультраструктурные исследования могут оказаться весьма полезными.

2.1.4. Культуры клеток

Ценную научную информацию может дать анализ культур опухолевых клеток и клеточных линий с определенным соотношением между гормонами и пептидами.

- а. Слой клеток, выращенных на пластиковых покровных стеклах, можно соответствующим образом обработать, затем разрезать на маленькие кусочки, заключить в смолу и разрезать вдоль. Клетки на стеклянных покровных стеклах сначала инкапсулируют. Для этого заполненную смолой

капсулу прижимают к стеклу и после полимеризации смолы отделяют стекло путем замораживания в жидком азоте. Слой клеток остается на поверхности блока.

- б. Клетки можно поместить в суспензии или на покровном стекле до их фиксации и обработки, как, например, при исследовании и идентификации лиганд-связывающих рецепторов. Лиганд наносят на свежие клетки, которые фиксируют до или после добавления первого антитела.

2.2. Фиксация

Как и при любом электронно-микроскопическом исследовании, для сохранения структуры ткани препарат необходимо как можно скорее фиксировать. Пептиды НЭС — низкомолекулярные, хорошо растворимые вещества, и при фиксации их нужно иммобилизовать в ткани. Преципитирующие фиксаторы, например спирт или ацетон, здесь не подходят — они могут экстрагировать пептидные антигены и не обеспечивают сохранность ультраструктуры ткани. Лучше использовать такие фиксаторы, как параформальдегид и глутаральдегид; они сшивают активные пептидные группы, а последующая обработка тетроксидом осмия фиксирует липидные мембраны. Однако фиксация не должна быть продолжительной, чтобы не повредить сайты связывания антигенов и не блокировать иммуноцитохимическое связывание. Для каждого антигена следует опытным путем подобрать наилучший фиксатор.

При работе с животными максимально быстрое и эффективное проникновение фиксатора в исследуемые органы обеспечивает перфузия.

Фиксаторы могут быть гиперосмотическими (как правило, они дают хорошие результаты, но иногда происходит экстракция некоторых антигенов) или изоосмотическими (по-видимому, последние предпочтительнее). Ниже мы детально рассмотрим некоторые из используемых в нашей лаборатории фиксаторов. Какодилатный буфер можно заменить фосфатным. Какодилат токсичен и может повредить нефиксированные клетки, но его используют для длительного хранения фиксированного материала, поскольку опасность застарения в таком буфере меньше, чем в фосфатном. Можно готовить фиксаторы на фосфатном буфере, а хранить ткани в какодилатном.

а. Глутаральдегид

Готовят 2,5% (в/о) глутаральдегид в 0,1М фосфатном буфере, рН 7,2. Хранят раствор при 4 °С. Глутаральдегид поступает в продажу в виде 25% раствора, иногда сверхчистого, но последнее не принципиально.

б. Тетроксид осмия

В темный флакон с 50 мл 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,0, погружают ампулу, содержащую 0,5 г тетроксид осмия; разбивают ампулу и оставляют флакон в таком виде на ночь для перемешивания его содержимого. Хранят раствор при 4 °С. Пары осмия токсичны, поэтому готовить раствор и выполнять все операции следует в вытяжном шкафу.

в. Глутаральдегид-формальдегидные смеси

Параформальдегид (для быстрого проникновения в ткань и фиксации антигенов) в фосфатном буфере смешивают с глутаральдегидом (для лучшего сохранения ультраструктуры) в разных пропорциях. Например, берут 4% параформальдегид/0,2% глутаральдегид; 3% параформальдегид/2% глутаральдегид (для быстрой фиксации) [8]; 2% параформальдегид/1% глутаральдегид.

Свободный от примесей (например, метанола) параформальдегид присутствует в имеющихся в продаже растворах формалина; его можно приготовить, как описано в протоколе 3.1.

Протокол 3.1. 4% параформальдегид в 0,1 М фосфатном буфере [10]

1. Взвешивают 8 г параформальдегида и растворяют его в 90 мл дистиллированной воды, размешивая при температуре 60 °С в вытяжном шкафу.
2. Добавляют по каплям 1,0 М гидроксид натрия, пока раствор не станет прозрачным.
3. Охлаждают раствор, доводят pH до 7,4 и добавляют дистиллированную воду до 100 мл.
4. Добавляют 100 мл 0,2 М фосфатного буфера, pH 7,4, и фильтруют раствор.

г. Периодат—лизин—параформальдегид [11]

Этот препарат специально создан для фиксации гликопротеинов клеточных мембран, однако он дает хорошие результаты и в других случаях, в частности при фиксации слизистых тканей и гликопротеиновых гормонов гипофиза. Приготовление этого фиксатора детально описано в протоколе 3.2.

Протокол 3.2. Периодат—лизин—параформальдегид

Раствор А: 0,1 М L-лизингидрохлорид в 0,05 М фосфатном буфере, pH 7,4

1. Растворяют 1,827 г L-лизингидрохлорида в 50 мл дистиллированной воды.

2. Доводят рН до 7,4 с помощью 0,1 М гидрофосфата натрия.
3. Доводят объем до 100 мл 0,1 М натрий-фосфатным буфером, рН 7,4.
4. Хранят раствор при 4 °С не более 10 сут.

Раствор Б: 8% параформальдегид

5. Готовят в соответствии с пп. 1–2 протокола 3.1. Профильтрованный раствор хранят при 4 °С.

Фиксация

6. Непосредственно перед фиксацией смешивают три части раствора А (15 мл) с одной частью раствора Б (5 мл). Добавляют метапериодат натрия до конечной концентрации 0,01 М (0,0428 г в 20 мл). Конечный рН раствора должен быть примерно равен 6,2.

д. Пикриновая кислота/параформальдегид в буфере Замбони [12]

Этот фиксатор, объединяющий преципитирующее действие пикриновой кислоты и способность формальдегида сшивать аминокруппы, оптимален для выявления пептидов. Его приготовление описано в протоколе 3.3.

Протокол 3.3. Фиксатор Замбони

1. Растворяют 20 г параформальдегида в 150 мл насыщенного водного раствора пикриновой кислоты, постоянно помешивая, при температуре 60 °С в вытяжном шкафу.
2. Добавляют по каплям 0,1 М гидроксид натрия, пока раствор не станет прозрачным.
3. Фильтруют раствор, охлаждают и доводят объем до 1 л фосфатным буфером (3,31 г $\text{NaH}_2\text{PO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 33,77 г $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в 1 л воды). Конечный рН 7,3, осмолярность 900 мОсм.

Имеется множество других фиксаторов, применяющихся в разных конкретных случаях. Описанные здесь фиксаторы с успехом используются нами для иммуноцитохимии пептидов. В общих чертах процедура фиксации описана в протоколе 3.4. Если важно сохранить ультраструктуру, несколько кусочков ткани следует дополнительно зафиксировать тетроксидом осмия. После фиксации осмием некоторые пептиды можно пометить иммунологически, предварительно обработав срезы метапериодатом [13].

Протокол 3.4. Фиксация

1. Фиксируют маленькие кусочки ткани ($< 1 \text{ мм}^3$) в подходящем фиксаторе от 30 мин до 2 ч при 4°C .
2. Промывают их при 4°C в трех сменах 0,1 М фосфатного буфера, pH 7,2, содержащего 0,1 М сахарозу, по часу в каждой смене. Оставляют ткань в этом же буфере на 1 ч или дольше, помня что при длительном хранении в буфере некоторые антигены могут экстрагироваться вследствие частичного разрушения сшивок.
3. Для сохранения морфологии и фиксации наиболее «трудных» пептидов выдерживают отдельные препараты в течение 1 ч в тетроксиде осмия (разд. 2.2.6).
4. Промывают кусочки ткани в буфере, как это описано в п. 2.
5. Дегидратацию и заключение в смолу проводят, как это описано в разд. 2.3.

2.3. Смолы

Препарат ткани, предназначенный для электронно-микроскопических исследований, нужно заключить в достаточно твердый материал, чтобы можно было получить ультратонкие срезы. Для иммуноцитохимии удобны как эпоксидные (аралдит, эпон), так и акриловые (ловикрил K4M, уайт LR) смолы.

Эпоксидные смолы не смешиваются с водой, поэтому после фиксации образцы ткани должны быть дегидратированы. Эти смолы полимеризуются при нагревании. Если иммуномечению подлежат термолабильные пептиды, то полимеризацию можно проводить в течение нескольких суток при температуре 37°C , а не при 60°C в течение ночи; иногда полимеризацию осуществляют в УФ-свете при комнатной температуре или 4°C (заметим, что при фиксации осмием последний способ непригоден). Заливка в эпоксидные смолы проводится обычным способом, как при любом электронно-микроскопическом исследовании. Чтобы предотвратить экстракцию антигенов, нужно сократить до минимума время дегидратации и импрегнации ткани.

Смола уайт LR немного смешивается с водой, поэтому ткани можно дегидратировать в 70% спирте, что уменьшает вероятность экстракции пептидных антигенов. Эта смола полимеризуется при нагревании и в нее удобно заключать ткани, фиксированные осмием. Проведя полимеризацию не до конца, получают более мягкие, чем обычно, блоки; они легче режутся, а срезы лучше окрашиваются. Подробнее эти вопросы рассматриваются в работе [14].

Еще более предпочтительна смола ловикрил К4М, поскольку она может полимеризоваться при весьма низкой температуре (-30°C) и очень быстро полимеризуется при 4°C и при комнатной температуре. Однако полимеризация ловикрила в УФ-свете исключает фиксацию осмием. Процедура заливки описана в работе [15], а также в инструкциях, прилагаемых к препарату.

Как эпоксидные, так и акриловые смолы можно использовать для приготовления полутонких ($0,3-1\text{ мкм}$) срезов. Их исследуют под световым микроскопом или проводят иммуноцитохимию с использованием световой микроскопии и сравнивают с результатами, полученными для ультратонких срезов, помещенных на сеточки. Перед иммуноокрашиванием таких полутонких срезов из них нужно удалить эпоксидные смолы, например с помощью спиртового раствора гидроксида натрия [16] (см. протокол 3.5). Срезы, заключенные в акриловые смолы, можно окрашивать сразу, но поскольку эти смолы гидрофильны (особенно уайт LR), в их присутствии срезы могут отлипнуть от стекол при окрашивании. Чтобы этого не произошло, следует использовать стекла, покрытые силиконом [17]. Для других смол подходят стекла, покрытые поли-L-лизинном [18]. Предметные стекла с полутонкими срезами следует в течение нескольких часов подсушить на столике с подогревом ($37-40^{\circ}\text{C}$) или оставить на ночь при 37°C . Пересушивание может привести к утрате антигенных свойств некоторыми пептидами.

Протокол 3.5. Удаление эпоксидной смолы из помещенных на стекло полутонких срезов

1. Готовят насыщенный раствор гидроксида натрия или калия в 100% спирте. Периодически встряхивают смесь несколько суток, пока раствор не станет желтовато-коричневым. Этот раствор можно использовать многократно, даже когда он станет темно-коричневым.
 2. Погружают стекла в раствор на 15–40 мин в зависимости от свежести раствора.
 3. Промывают срезы в двух сменах 100% спирта, по 10 мин в каждой. Убеждаются, что смола удалена полностью:
 - а) после испарения спирта срезы должны стать белого цвета;
 - б) убеждаются, что смолы не осталось, просмотрев влажные срезы под микроскопом при низко опущенном конденсоре; при необходимости процедуру удаления повторяют.
 4. Помещают срезы в 70% спирт, а затем в воду. Для иммуноокрашивания годится любой метод.
-

2.4. Приготовление срезов

Окрашивают срез толщиной 1 мкм толудиновым синим и убеждаются, что на срезе присутствует нужная структура. Затем готовят ультратонкие срезы (60–100 нм), которые в отраженном свете имеют цвет от золотистого до серого. Помещают срезы на чистые, не покрытые пленкой никелевые или золотые сеточки (200–300 меш) и оставляют на ночь. Срезы могут храниться на таких сеточках закрытыми неограниченно долго.

2.4.1. Выбор блока

Подбирают удобный для ультратонких срезов режим контрастирования. Если это нужно, окрашивают сначала полутонкие срезы, чтобы убедиться в сохранности антигена после фиксации и в активности антител. Впрочем, этот тест нельзя считать надежным, поскольку метка может обнаруживаться на ультратонких срезах, но не детектироваться на полутонких. Одна из причин такого несоответствия состоит в том, что многие иммуноцитохимические методы с применением световой микроскопии не обладают достаточной чувствительностью для выявления малых количеств иммунореактивных гранул. Вместо этого можно использовать электронную микроскопию препаратов, меченных коллоидным золотом.

2.5. Иммуномечение

Процедуры, использующиеся в электронно-микроскопической иммуноцитохимии, аналогичны таковым в случае иммуноцитохимии с использованием светового микроскопа.

2.5.1. Оборудование

- Пинцеты для сеточек (они не должны намагничиваться и смачиваться).
- Парафиновая пластинка (например, парафин, залитый в чашку Петри) или полоски парафилма для нанесения буфера и других реактивов, в которых должны плавать сеточки.
- Планшет Тerasaki с большим числом ячеек на 15 мкл.
- Миллипоровые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм и шприцы.

2.5.2. Разведение антител

Лучше использовать апробированные первые антитела, для которых уже подобраны соответствующие разведения.

- а. Чтобы уменьшить фон, обусловленный неспецифическим связыванием, используют как можно более сильные разведения поликлональных антител. Для работы с такими разведениями необходима длительная инкубация срезов с антителами (например, в течение ночи). Присутствие белковых примесей в препаратах моноклональных антител роли не играет, поэтому их сильное разведение необязательно.
- б. Чтобы подобрать подходящее разведение, проверяют иммунологические реактивы, наслаиваемые во вторую и третью очередь, на заведомо позитивной ткани (гл. 2). Менять подобранные разведения нет необходимости, поскольку антитела всегда находятся в избытке по отношению к своим антигенам.
- в. Для разведения антител используют 0,01 М фосфатный буфер, pH 7,2–7,4, содержащий 0,15 М хлорид натрия (ФСБ), или 0,05 М трис-HCl, pH 7,6, с такой же концентрацией хлорида натрия (ТСБ), содержащие около 0,1% инертного белка, например БСА (свободная от глобулинов фракция), который будет конкурировать с антителами за места неспецифического связывания на стенках посуды. Для подавления роста грибов в буфер следует также добавить азид натрия (0,01–0,1%). Этого не нужно делать при работе с реагентами, связывающими пероксидазу, поскольку азид натрия является ингибитором последней.

2.5.3. Блокирование неспецифического связывания

Для блокирования неспецифического связывания можно предварительно проинкубировать препараты с неиммунной сывороткой, полученной от тех же видов, что и вторые антитела.

- а. Если используется белок А (см. протокол 3.7), то сыворотка не требуется, поскольку этот белок неспецифически связывает иммуноглобулины, которые могут присутствовать в блокирующей сыворотке. Используют инертный белок, например БСА или альбумин куриного яйца.
- б. В случае авидин-биотинового метода яичный альбумин лучше не использовать, поскольку он содержит авидин, который может связывать вносимый биотинилированный реагент.

2.5.4. Хранение и использование антител

- а. Хранят аликвоты первых антител в быстрозамороженном растворе (разд. 2.5.2.в): низкие разведения (1:10–1:50) — при -20°C , рабочие разведения — при 4°C . Не следует

медленно замораживать или повторно замораживать оттаивать растворы. Моноклональные антитела должны оставаться незамороженными до перенесения в холодильник всего маточного раствора или их следует хранить в глицерине в разведении 1:1 при -20°C , поскольку данный раствор не замерзает при этой температуре. Реагенты, сорбировавшие коллоидное золото, можно хранить -20°C в аликвотах с 20% глицерином.

- б. Чтобы избавиться от агрегатов и немеченых антител, центрифугируют адсорбировавшие коллоидное золото антитела при 2000 g в течение 10 мин. Используют ровно окрашенный средний слой. Агрегация уменьшается, если антитела хранятся в буфере с высоким pH (0,05 М трис-HCl, pH 9,0 в присутствии 0,15 М хлорида натрия, концентрированный (1,0%) инертного белка, например БСА, и азида натрия).

2.5.5. Иммуномечение

- а. «Травление» пероксидом водорода (протокол 3.6, п. 1), видимому, улучшает проницаемость смолы. Эта операция необязательна, если смола не до конца затвердела.
- б. Для тканей, фиксированных осмием, вместо пероксида водорода используют водный раствор метапериодата (~5%). Он приводит к повторному окислению осмия, он вновь становится растворимым, и блокированный антиген демаскируется [13]. Обычно время экспозиции составляет около 10 мин, но при необходимости его можно подобрать опытным путем.
- в. Сеточки должны плавать в каплях раствора срезом вниз и быть погружены в раствор объемом 15 мкл, находящийся в ячейках планшета для микротестирования; в последнем случае для антител доступны обе стороны среза.
- г. Все растворы следует профильтровать через миллипорные фильтры с размером пор 45 нм.
- д. Сеточки нужно промыть под струей воды из шприца и промокнуть микрофильтром. Если препаратов много, то помещают сеточки в ячейки с промывающим раствором на пластинах для микротестирования и осторожно встряхивают пластины на механическом встряхивателе. Несколько раз меняют раствор. Можно поместить сеточки в держатель с пронумерованными прорезями, а затем в емкость с буфером промывки, которую слабо встряхивают. Правда, при этом приходится фильтровать очень большие объемы буфера.
- е. Во время мечения сеточки не должны высыхать.

а. Непрямое иммуномечение коллоидным золотом (протокол 3.6)

Протокол 3.6. Непрямое иммуномечение коллоидным золотом ультратонких срезов, помещенных на сеточки и заключенных в аралдит или эпон

Материалы

- 10% водный раствор пероксида водорода
- Насыщенный водный раствор метапериодата натрия (примерно 5%)
- Буферные растворы: 0,05 М трис-НСl, pH 7,4; 0,05М трис-НСl, pH 7,4, содержащий 0,1% (в/о) БСА; 0,05М трис-НСl, pH 8,2, содержащий 1% БСА
- Первые и соответствующие вторые антитела, меченные золотом

Методика

1. Для тканей, не фиксированных осмием: «протравливают» сеточки 10 мин на капле 10% пероксида водорода. Для тканей, фиксированных осмием: используют насыщенный водный раствор метапериодата натрия (10–30 мин).
2. Промывают сеточки в воде, профильтрованной через миллипоровый фильтр.
3. Промокают сеточки уголком неволокнутой фильтровальной бумаги, затем инкубируют их 30 мин в блокирующей сыворотке или белке (разд. 2.5.3).
4. Не промывая, осушивают сеточки, как в п.3, и инкубируют с первым антителом в соответствующем разведении 1 ч или оставляют на ночь при 4 °С. Оптимальное время инкубации и разведение следует подобрать опытным путем.
5. Промывают сеточки в пяти сменах 50 мМ трис-НСl, pH 7,4, примерно по 1 мин в каждой смене, со встряхиванием.
6. Промывают сеточки в трех сменах 50 мМ трис-НСl, pH 7,4, содержащего 0,1% БСА, примерно по 1 мин в каждой смене, со встряхиванием.
7. Помещают сеточки на 10-15 мин в каплю 50 мМ трис-НСl, pH 8,2, содержащего 1% БСА.
8. Разводят меченное золотом второе антитело (например, козы антитела к иммуноглобулину кролика) в 50 мМ трис-НСl, pH 8,2, содержащем 1% БСА, до оптимальной концентрации и 10 мин центрифугируют раствор при 200 g для удаления микроагрегатов частиц коллоидного золота.

Протокол 3.6 (Продолжение)

9. В течение 1 ч инкубируют срезы в каплях супернатанта при комнатной температуре.
 10. Тщательно промывают сеточки в трех сменах 50 мМ трис-НСl, рН 7,4, содержащего 0,1% БСА, примерно по 1 мин в каждой смене, затем — в пяти сменах 50 мМ трис-НСl, рН 7,4, без БСА, по 1 мин в каждой смене, и в пяти сменах дистиллированной воды, по 1 мин в каждой. На этой стадии сеточки можно высушить.
 11. Контрастируют срезы уранилацетатом и цитратом свинца, как для обычной электронной микроскопии.
-

б. Мечение комплексом белок А — золото

Этот метод используют, когда первое антитело происходит от вида, для которого нет антитела, адсорбирующего золото. Белок А из бактерии *Staphylococcus aureus* связывается с Fc-участком иммуноглобулиновых молекул многих видов (но плохо связывается с крысиными и козьими иммуноглобулинами и с некоторыми подвидами человеческого и мышинного IgG). Сходным образом ведет себя и белок G, но он связывается с менее широким кругом иммуноглобулинов. Комплекс белок А (или G) с золотом обладает тем преимуществом перед антителами, связанными с золотом, что он менее склонен к агрегации и поэтому его можно разводить в буфере с рН 7,0–7,6 (содержащем 0,1% БСА и азид натрия), ФСБ. Процедура мечения описана в протоколе 3.7.

Протокол 3.7. Мечение комплексом белок А — золото

- 1 и 2. Аналогично соответствующим пунктам протокола 3.6.
 3. Для блокирования используют инертный белок, но не сыроворотку (разд. 2.5.3.а).
 4. Аналогично п. 4 протокола 3.6.
 5. Аналогично п. 5 протокола 3.6, с использованием в качестве промывочного буфера ФСБ.
 6. Аналогично п. 6 протокола 3.6, с использованием ФСБ (разд. 2.5.2.в).
 7. Инкубируют сеточки 1 ч при комнатной температуре с комплексом белок А — золото, разведенным соответствующим образом в ФСБ, содержащем БСА.
 8. Промывают сеточки, как описано в п. 10 протокола 3.6, в ФСБ, содержащем БСА, затем в ФСБ и в дистиллированной воде.
 9. Контрастируют срезы уранилацетатом или цитратом свинца.
-

в. Авидин-биотиновые методы

Авидин метят коллоидным золотом и, используя его очень высокое сродство к биотину, связывают с соответствующим биотинилированным вторым антителом в ходе трехэтапного процесса (гл. 2). Лучше использовать стрептавидин, аналогичный по своим свойствам авидину, но менее активно связывающийся с заряженными группами. Авидин-биотиновые методы высокочувствительны, поскольку в месте связывания антигена с антителом скапливается большое количество метки. Процедура мечения описана в протоколе 3.8.

Протокол 3.8. Иммуномечение с помощью меченного золотом авидина

- 1 и 2. Аналогично соответствующим пунктам протокола 3.6.
 3. В качестве блокирующего реагента используют сыворотку (разд. 2.5.3.6).
 - 4-6. Аналогично пп. 4-6 протокола 3.7.
 7. Инкубируют срезы в течение 1 ч при комнатной температуре с биотинилированными антителами, происходящими от тех же видов, что и первые антитела, и разведенными в ФСБ или в ТСБ с БСА (разд. 2.5.3.в).
 8. Тщательно промывают сеточки сначала в ФСБ или ТСБ, содержащих БСА, а затем в ФСБ или ТСБ без БСА.
 9. Инкубируют срезы в течение 1 ч со стрептавидином, меченным золотом и разведенным в ФСБ или ТСБ.
 10. Промывают сеточки в ФСБ, а затем в дистиллированной воде. Контрастируют срезы.
-

2.5.6. Усиление с помощью серебра

Наиболее эффективными метками являются частицы золота диаметром 1–5 нм. Однако столь мелкие гранулы трудно увидеть под микроскопом, и чтобы повысить чувствительность метода без ухудшения разрешения, их можно увеличить с помощью металлического серебра, которое аккумулируется вокруг каждой такой гранулы. Размеры этой серебряной оболочки растут экспоненциально и их необходимо контролировать добавлением в раствор гуммиарабика. Усиление серебром нежелательно использовать при окрашивании срезов, фиксированных осмием. Для проявления вполне пригодны имеющиеся в продаже проявители; состав одного из таких проявителей с ацетатом серебра приведен в протоколе 3.9 [20].

Протокол 3.9. Метод усиления серебром

Материалы

- Маточный раствор гуммиарабика: растворяют 100 г гуммиарабика в 200 мл дистиллированной воды и перемешивают несколько часов. Оставляют раствор на 4 сут при комнатной температуре, а затем фильтруют его через несколько слоев марли. Разливают на порции и хранят при -20°C
- Цитратный буфер: растворяют 2,35 г цитрата натрия $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 2,55 г лимонной кислоты в 85 мл дистиллированной воды. Доводят pH до 3,8
- 1% (о/о) уксусная кислота
- 20% тиосульфат натрия

Методика

1. После окрашивания срезов антителами, меченными золотом, не контрастируют их, но фиксируют на сеточках 10 мин в 2% глутаральдегиде, чтобы предотвратить смывание низкоаффинных антител проявителем, содержащим ацетат серебра.
2. Тщательно промывают сеточки в дистиллированной воде.
3. Готовят серебряный проявитель из следующих компонентов:

• Ацетат серебра ¹⁾	10 мг
• Дистиллированная вода	5 мл
• Маточный раствор гуммиарабика	2,5 мл

Непосредственно перед использованием в проявитель добавляют гидрохинон (25 мг), растворенный в 5 мл цитратного буфера, pH $\sim 3,8$.
4. Помещают сеточки на капли серебряного проявителя на 1–15 мин (время проявления подбирается опытным путем).
5. Промывают сеточки в дистиллированной воде 30 с.
6. Промывают сеточки в 1% уксусной кислоте 10 с.
7. Промывают сеточки в дистиллированной воде 30 с.
8. Фиксируют срезы в 20% тиосульфате натрия в течение 3 мин.
9. Промывают сеточки в трех сменах дистиллированной воды, по 5 мин в каждой.
10. Контрастируют срезы уранилацетатом и цитратом свинца.

¹⁾ Серебряный проявитель не чувствителен к свету, поэтому проявление не нужно проводить в темной комнате при красном свете. Лучше всего использовать тонкодисперсный порошок ацетата серебра фирмы Fluka.

2.5.7. Двойное окрашивание антителами, меченными золотом

Можно приготовить препараты коллоидного золота, различающиеся по диаметру частиц, и проводить окрашивание одновременно по двум антигенам. При этом следует помнить, что используемые антитела не должны давать перекреста (см. о мерах предосторожности в соответствующем разделе гл. 2, где речь идет о световой микроскопии).

Выбор конкретной методики зависит от происхождения первых антител. Если имеются мышинные моноклональные антитела к одному антигену и кроличьи поликлональные антитела к другому, можно использовать одновременное двойное мечение [21] — наиболее простой и эффективный способ. Оба первых антитела наносят на препарат в виде смеси с заранее выбранной оптимальной концентрацией каждого антитела. Затем наслаивают два меченных золотом с разным размером гранул антитела к мышинным и кроличьим иммуноглобулинам. Антитела происходят от одного вида или от видов, не дающих перекрестной реакции. Например, можно использовать козы антитела к IgG мыши, связанные с частицами золота диаметром 10 нм, и козы антитела к IgG кролика, связанные с частицами золота диаметром 20 нм. Этот метод аналогичен методу одноэтапного мечения (протокол 3.6). Козы антитела к IgG кролика можно заменить овечьими, поскольку эти виды родственны, но не кроличьими антителами; последние дают перекрестную реакцию с козьими (овечьими) антителами к IgG кролика. Очень важен

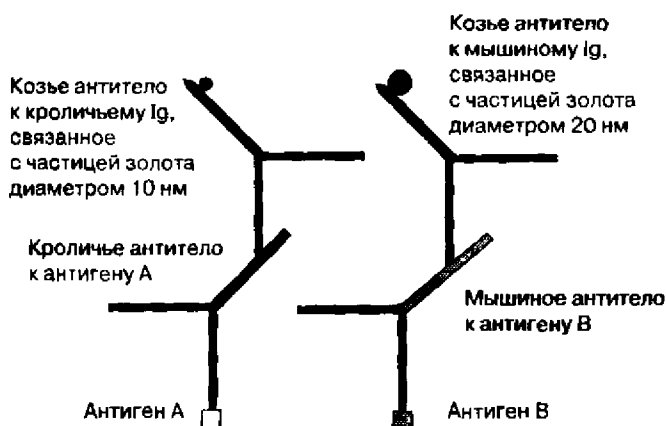


Рис. 3.2. Одновременное двойное иммуномечение с использованием первых антител, происходящих от разных видов [21].

относительный размер частиц золота; например, следует использовать частицы диаметром 10 и 20 нм, а не 15 и 20 нм (рис. 3.2).

При условии, что используемые вторые антитела не дают перекрестной реакции, метод непрямого мечения можно с успехом комбинировать с биотинилированием второго антитела и нанесением третьего слоя — конъюгированного с золотом авидина. Однако использование даже последовательно наслаиваемых авидин-биотиновых комплексов проблематично, поскольку вторые биотинилированные антитела могут связываться со свободными участками первых, связанных с меченным золотом биотином. Для блокирования свободных мест связывания между первыми антителами, конъюгированными с авидином, и вторыми, биотинилированными антителами, должен находиться слой неконъюгированного биотина.

Аналогичные проблемы возникают в случае двойного мечения с использованием комплекса белок А — золото [22]. В данном случае наслаивание не может быть одновременным даже для двух первых антител. Этот метод используется тогда, когда два первых антитела происходят от одного и того же вида. После идентификации первого антитела с помощью конъюгата белка А с частицами золота одного размера свободные сайты связывания белка А на молекулах первого антитела блокируют немеченым белком А, а затем наносят раствор антитела ко второму антигену. Эти антитела будут связываться со своим антигеном в ткани, а некоторые молекулы — также с «промежуточным» белком А, связанным с

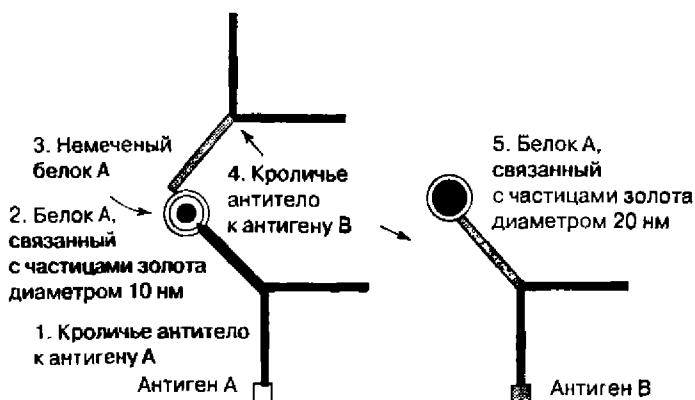


Рис. 3.3. Двойное мечение с использованием комплекса белок А — золото и первых антител, происходящих от одного вида [22].

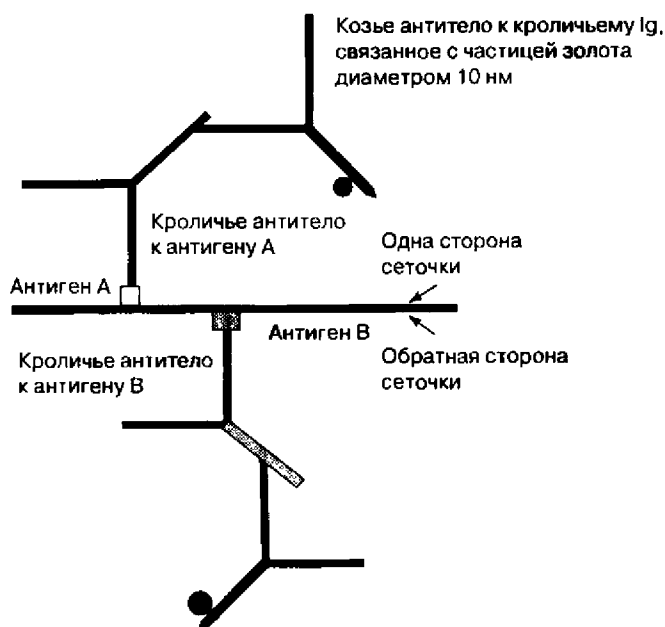


Рис. 3.4. Двустороннее двойное мечение иммунозолотом с использованием первых антител, происходящих от одного вида [23].

первым антигеном. Однако когда все сайты связывания белка А на молекулах первого антитела будут заняты, они уже не смогут связываться с белком А третьего слоя, меченым частицами золота другого размера (рис. 3.3).

Еще один способ двойного мечения с помощью первых антител от одного и того же вида состоит в мечении одного антигена с одной стороны сеточки, а второго — с обратной стороны [23]. Срезы настолько тонкие, что под микроскопом видны обе стороны, как будто метки находятся на одной поверхности. Антитела наносят последовательно; сеточки помещают на капли растворов антител так, чтобы они плавали на поверхности, не погружаясь, что превращает переход антител с одной поверхности на другую. Для этого после нанесения метки на одну из сторон покрывают сеточку с этой стороны формваровой пленкой и лишь потом метят вторую сторону. Следует иметь в виду, что для реагентов доступна только поверхность среза, поэтому более глубокие структуры, экзюнированные лишь на обратной стороне среза, могут связывать только вторые антитела, хотя содержат два антигена (рис. 3.4).

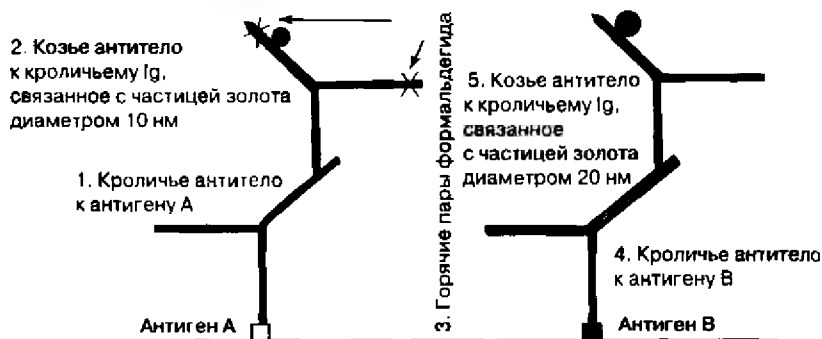


Рис. 3.5. Двойное мечение иммунозолотом с использованием антител, происходящих от одного вида. Перед нанесением второго слоя сайты связывания свободного иммуноглобулина блокируют горячими парами формальдегида [24].

Наконец, при третьем способе двойного мечения [24] с использованием первых антител от одного и того же вида сначала наносят первое антитело, меченное золотом, затем сеточки промывают в дистиллированной воде и сушат. Далее их выдерживают 15–60 мин в парах формальдегида, образующихся над порошком параформальдегида, в плотно закрытом бюксе при 80 °С; время экспозиции подбирают опытным путем. При этом блокируются все сайты связывания в первом слое иммуноглобулиновых реагентов. Затем сеточки промывают, чтобы удалить избыток формальдегида, и наносят второе антитело, конъюгированное с золотом. Необходимо убедиться в сохранности антигенов после обработки образца горячими формальдегидными парами и в полном блокировании сайтов связывания иммуноглобулина. Для этого на срез наносят раствор любого антитела от того же вида, от которого взяты первые антитела и вторые антитела к иммуноглобулину, меченные золотом (рис. 3.5). Все операции с формальдегидом следует проводить в вытяжном шкафу.

Комбинируя эти методы, на одном и том же препарате можно пометить три и более антигенов. Например, при двойном мечении антителами, конъюгированными с золотом, с каждой из двух сторон сеточки можно выявить четыре антигена. С ростом числа антигенов требования к размеру частиц золота становятся все строже. Желательно измерить на электронных микрофотографиях отдельные частицы конъюгированного с соответствующими реагентами золота в каплях, иммобилизованных на поли-L-лизиновой или формваровой пленке.

2.6. Контроли

Контроль в электронно-микроскопической иммуноцитохимии не менее важен, чем в световой (см. гл. 2). Он осуществляется на трех уровнях.

2.6.1. Контроль реагентов

Совершенно необходимо, чтобы первые антитела были специфичны по отношению к своим антигенам. Любые перекрестные реакции, например связывание с другими членами того же семейства пептидов, необходимо выявить иммунологическими методами и тестированием под световым микроскопом. Даже после такой проверки при нанесении слоя желательно поставить тест на адсорбцию, добавив к разведенному антителу избыток антигена, чтобы нейтрализовать его иммунореактивность, убедившись, что родственные антигены не взаимодействуют и, следовательно, окрашивание обусловлено специфическим взаимодействием антигена с антителом, а не каким-то случайным связыванием. Некоторые антитела связываются с основными остатками, часто встречающимися в пептидах, и можно подумать, что имеет место специфическое связывание, поскольку иммунореактивность блокируется добавлением данного антигена (основного пептида [25]). Однако, если такой же эффект наблюдается при добавлении к разбавленным антителам поли-L-лизина (мол. масса 3000–6000, 2 мг/мл), то есть основание думать о неспецифическом связывании. При наличии перекрестных реакций между антителами и пептидами из того же семейства, обусловленных наличием аминокислотных последовательностей с одинаковыми антигенными свойствами, единственный выход состоит в использовании сайт-специфичных антител с уникальной антигенной последовательностью.

2.6.2. Отрицательный контроль

Чтобы определить уровень неспецифического связывания с тканью, первое антитело нужно заменить неиммунной сывороткой или неактивными антителами.

2.6.3. Положительный контроль

Для каждого первого антитела проводят положительный контрольный опыт; его цель — убедиться в активности антител и в том, что можно доверять отрицательным результатам, полученным на исследуемом препарате.

2.7. Фоновое мечение

Сильный фон затрудняет анализ результатов. Перечислим причины его возникновения и способы их устранения.

- а. Концентрация первого антитела слишком высока:
 - разводят антитело сильнее.
- б. Иммуноглобулины связываются альдегидами, которые остались в ткани после фиксации:
 - начинают мечение с 30-минутной инкубации сеточек в свежеприготовленном 1% боргидриде натрия или добавляют в блокирующий раствор хлорид аммония (50–100 мМ).
- в. Иммуноглобулины связываются с заряженными участками в ткани:
 - увеличивают концентрацию блокирующей сыворотки (иногда используют даже неразведенную сыворотку);
 - увеличивают концентрацию хлорида натрия в буфере для разведения антител до 2,5%.
- г. Реагент, конъюгированный с золотом, аккумулирует агрегаты частиц коллоидного золота:
 - отделяют агрегаты центрифугированием (2000 g, 10 мин).
- д. Вторые антитела дают перекрестную реакцию с иммуноглобулинами ткани хозяина:
 - реактивность вторых антител подавляют добавлением к разведенным вторым антителам 1% сыворотки, полученной от вида-хозяина.

2.8. Неожиданный отрицательный результат

Если оставить в стороне проблему утраты антигенов при фиксации и обработке препаратов или очевидные ошибки в выполнении соответствующих операций, то для решения проблемы можно предложить несколько способов.

- а. Проверяют, чтобы раствор антител, связанных с золотом, не содержал немеченых иммуноглобулинов [26].
- б. Увеличивают время протравливания/окисления (при заключении в эпоксидные смолы).
- в. Увеличивают концентрацию антител, особенно вторых.
- г. Используют очень чувствительный метод, например авидин-биотиновый с антителами, меченными золотом, или — для улучшения связывания антител с антигенными сайтами — повторяют этапы окрашивания несколько раз. Усиливают золотую метку серебром.

2.9. Количественная обработка данных [27]

Чтобы определить количество антигена в ткани, проще всего подсчитать частицы золота над сайтами связывания. Но содержание метки на конкретном срезе зависит от способов фиксации и обработки ткани, состава смол, степени мечения реагентов и концентрации антител по отношению к антигенам, а также от молекулярных взаимодействий между тканевыми антигенами и иммуноцитохимическими реагентами, наносимыми на препарат. Поэтому такая количественная оценка невозможна. Лучше всего, тщательно контролируя условия, провести сравнительную оценку иммунореактивности на разных препаратах, исходя из плотности мечения. Более точные количественные результаты (но тоже сравнительные) дает использование радиоактивной метки, однако радиоавтографические методы создают другие проблемы. Некоторую информацию можно получить, определив площадь, занятую иммунореактивными структурами, или число иммунореактивных клеток и гранул с помощью автоматического анализатора изображений. Но пока такая оценка остается во многом субъективной, и электронно-микроскопическая иммуноцитохимия по-прежнему является количественной методикой, по крайней мере если речь идет о выявлении пептидов нейроэндокринной системы.

Литература

1. Solcia E., Pearse A. G. E., Grube D., Kobayashi S., Bussolati G., Creutzfeldt W., Gepts W. (1973). *Gastroenterology*, **5**, 13.
2. Grimelius L., Wilander E. (1980). *Invest. Cell Pathol.*, **3**, 3.
3. Polak J. M., Pearse A. G. E., Heath C. M. (1975). *Gut*, **16**, 225.
4. Cameron C. H. S., Allen I., Ozo C., Kennedy L., Atkinson B., Haddon D. (1990). *J. Pathol.*, **161**, 239.
5. Varndell I. M., Sikri K. L., Hennessy R. J., Kalina M., Goodman R. H., Benoit R. et al. (1986). *Cell Tiss. Res.*, **246**, 197.
6. Beesley J. (1989). *Colloidal gold: a new perspective for cytochemical marking*. Oxford University Press, Oxford.
7. Polak J. M., Varndell I. M. (ed). (1984). *Immunolabelling for electron microscopy*. Elsevier, Amsterdam.
8. Larsson L.-I. (1988). *Immunocytochemistry: theory and practice*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
9. Beesly J. (ed). (1992). *Immunocytochemistry: a practical approach*. IRL Press, Oxford. (In press).
10. Pease D. C. (1962). *Anat. Rec.*, **142**, 342.
11. McLean J. W., Nakane P. K. (1974). *J. Histochem. Cytochem.*, **22**, 1077.
12. Stefanini M., De Martino C., Zamboni L. (1967). *Nature (Lond.)*, **216**, 173.
13. Bendayan M., Zollinger M. (1983). *J. Histochem. Cytochem.*, **31**, 101.

14. Newman G. R., Hobot J. A. (1987). *J. Histochem. Cytochem.*, **35**, 971.
15. Carlemalm E., Garavito R. M., Villiger W. (1982). *J. Microsc.*, **126**, 123.
16. Lane B. P., Europa D. L. (1965). *J. Histochem. Cytochem.*, **13**, 579.
17. Burns J. (1987). *J. Clin. Pathol.*, **40**, 858.
18. Huang W. M., Gibson S. J., Facer P., Gu J., Polak J. M. (1983). *Histochemistry*, **77**, 275.
19. Roth J., Ravazzola M., Bendayan M., Orci L. (1981). *Endocrinology*, **108**, 247.
20. Hacker G. W., Grimelius L., Danscher G., Bernatzky G., Muss W., Adam H., Thurmer T. (1988). *J. Histochem. J.*, **11**, 213.
21. Tapia F. J., Varndell I. M., Probert L., De Mey J., Polak J. M. (1983). *J. Histochem. Cytochem.*, **31**, 977.
22. Roth J. (1982). *Histochem. J.*, **14**, 791.
23. Bendayan M. (1982). *J. Histochem. Cytochem.*, **30**, 81.
24. Wang B.-L., Larsson L.-I. (1985). *Histochemistry*, **83**, 47.
25. Scopsi L., Wang B.-L., Larsson L.-I. (1986), **83**). *J. Histochem. Cytochem.*, **34**, 1469.
26. Kramarcy N. R., Sealock R. (1991). *J. Histochem. Cytochem.*, **39**, 37.
27. Kraehenbuhl J. P., Racine L., Griffiths G. W. (1980). *Histochem. J.*, **12**, 317.

МЕТОДИКА ВЫЯВЛЕНИЯ ДНК/РНК С ПОМОЩЬЮ ГИБРИДИЗАЦИИ IN SITU

Саймон Херрингтон, Джеймс О'Д. Макги

1. Введение

Гибридизация in situ (ГИС) — это метод прямого выявления нуклеиновых кислот в клеточных структурах в условиях, позволяющих одновременно исследовать их морфологию. В ядре и цитоплазме клеток присутствуют нуклеиновые кислоты двух видов — ДНК и РНК, и методы их обнаружения зависят от свойств тех структур, в которых они находятся. Задача осложняется тем, что при проведении ГИС приходится иметь дело с самыми разными объектами — от индивидуальных хромосом в метафазных пластинках до архивных залитых в парафин биоптатов. Тем не менее при определенных условиях удастся не только идентифицировать нормальные или аномальные нуклеиновые кислоты, но и установить соответствующую корреляцию с морфологией клеток и тканей. Метод ГИС позволяет получить важную информацию о структуре и функционировании клеток при различных заболеваниях, а при параллельном применении других методов (например, иммуноцитохимии) удастся исследовать статические и динамические особенности клеток и сопоставить их с морфологией клеток и тканей.

Впервые метод ГИС с использованием ^{32}P -меченных зондов был описан в 1969 г. [1, 2]. Последующее развитие технологии рекомбинантных ДНК и методов изотопного мечения позволило выявлять уникальные гены на метафазных хромосомах [3]. С разработкой нерадиоактивных методов мечения метод ГИС стал более безопасным и простым, и в настоящее время высокой чувствительности удастся достичь и без применения радиоизотопов [4]. С созданием зондов, меченных с помощью нерадиоактивных молекул-свидетелей, метод ГИС стал и более универсальным, поскольку для обнаружения нужных молекул теперь появилась возможность использовать иммунные и аффинные гистохимические методы. Дальнейшее совершенствование методологии ГИС позволит применять этот метод в клинической практике как рутинный.

В этой главе мы рассмотрим основные принципы ГИС, обращая внимание прежде всего на более приемлемые для рутинного применения в лабораторной практике неизотопные методы. Соответствующие методики с использованием изотопно меченных зондов описаны в гл. 5 и 7. Каждый раздел главы сопровождается описанием основных этапов метода в целом. Более детальная информация об использовании ГИС в различных конкретных случаях приведена в гл. 5–9. Материал этой главы, с одной стороны, служит введением в методологию ГИС, а с другой — содержит практические данные и может рассматриваться как первый шаг к более полному знакомству с использованием ГИС в научных и диагностических целях.

2. Выбор методики

Выбор конкретной методики гибридизации, оптимальной для данного эксперимента, зависит от следующих факторов:

- природа нуклеиновой кислоты-мишени;
- чувствительность;
- специфичность;
- вопросы практического характера: стоимость, безопасность, наличие оборудования и реактивов.

2.1. Нуклеиновая кислота-мишень

Методики выявления РНК и ДНК с помощью ГИС различаются [5, 6]. Это относится ко всем этапам — от получения клеток и тканей до способов детекции. Аналогичным образом, разные методические приемы необходимы для выявления вирусной ДНК в инфицированной клетке и локализации геномной ДНК в той же ткани [7, 8]. Выбор того или иного варианта ГИС определяется характером эксперимента, и описанные в этой и последующих главах методы могут служить только отправной точкой в решении конкретной экспериментальной задачи.

2.2. Чувствительность

Для выявления последовательностей, представленных небольшим числом копий (например, при эпидемиологическом изучении латентных вирусных инфекций), метод ГИС должен обладать высокой чувствительностью. Однако известны случаи, когда, напротив, лучше использовать малочувствительные методики. В

качестве примера можно привести выявление повторяющихся последовательностей (типа повторов на длинном плече Y-хромосомы; см. гл. 6). Если использовать высокочувствительные методы, то будут регистрироваться не только эти высокоповторяющиеся последовательности, но и последовательности на других хромосомах, где они представлены небольшим числом копий. Чувствительность метода зависит от особенностей всех его этапов, начиная от фиксации препарата и кончая выбором фермента для детекции. Более подробно эти вопросы рассмотрены в разд. 3.

2.3. Специфичность

Специфичность метода зависит как от условий гибридизации, так и от условий последующего отмывания препарата. Подробно вопросы специфичности ГИС будут рассмотрены ниже, но то, что есть возможность проводить гибридизацию в жестком или мягком режиме, является одним из достоинств метода, поскольку это позволяет выявлять последовательности-мишени, обладающие разной степенью гомологии с используемым зондом. Этот момент очень важен для диагностики инфекций, вызываемых вирусами близких видов. Необходимо отметить, однако, что прежде чем приступать к анализу, необходимо точно определить «разрешающую способность» конкретных условий гибридизации (более подробно эти вопросы рассмотрены в работе [9]). Далее, все сказанное выше предполагает, что получаемый при гибридизации сигнал обусловлен специфичной гибридизацией зонда с гомологичной мишенью в ткани. Убедиться в этом можно, проведя соответствующие контрольные опыты (разд. 4).

2.4. Лабораторные аспекты

Безопасность метода ГИС зависит от характера используемых молекул-свидетелей. Неизотопные его варианты значительно более безопасны, чем те, в которых используются радиоактивно меченные зонды (см. ниже). Стоимость анализа определяется затратами на иммуноцитохимический тест и на очистку и мечение зондов. Эти затраты сильно зависят от используемых зондов и способов мечения. Окончательный выбор того или иного метода зависит также от наличия нужных оборудования и реактивов.

3. Принципы гибридизации *in situ*

Основные принципы метода ГИС проиллюстрированы на рис. 4.1. Ниже мы рассмотрим все его этапы.

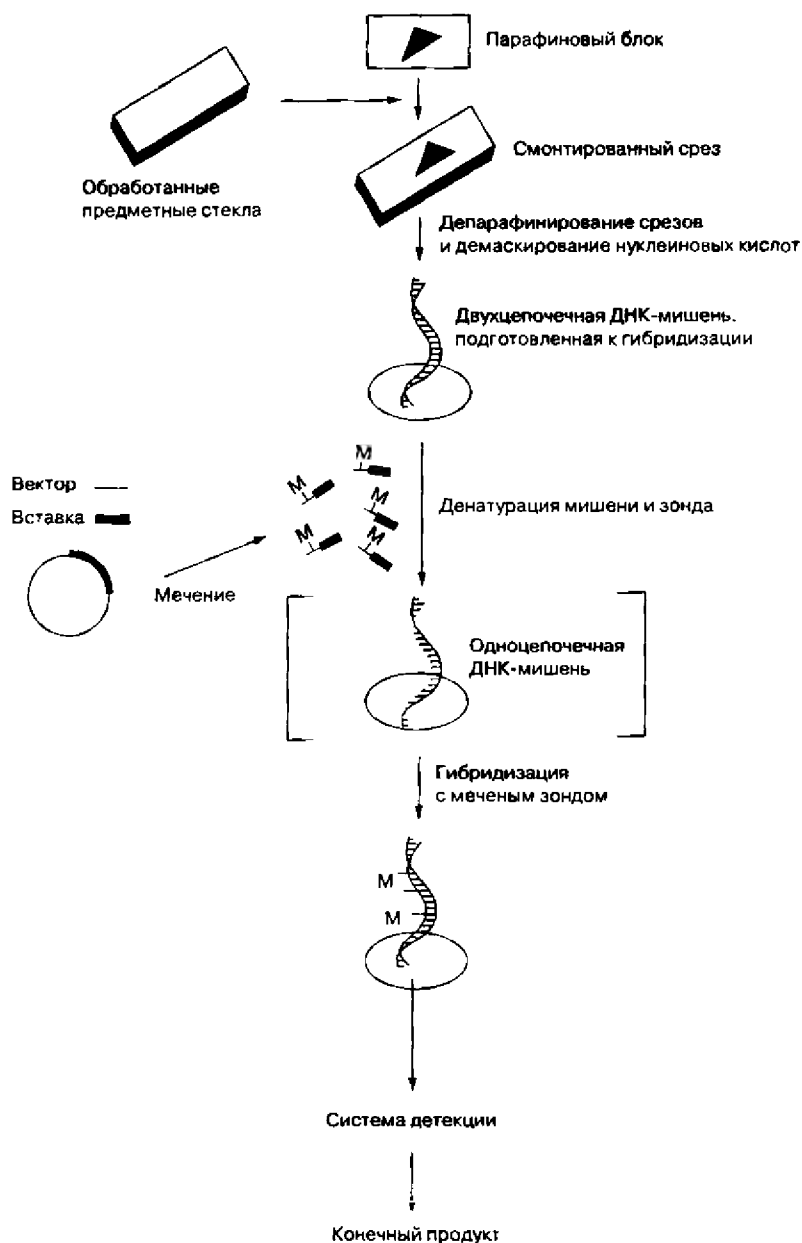


Рис. 4.1. Схематическое представление процедуры гибридизации *in situ*.
М — метка.

3.1. Выбор молекулы-свидетеля

При выборе молекулы-свидетеля необходимо учитывать следующие факторы:

- безопасность;
- чувствительность;
- характер зонда;
- характер нуклеиновой кислоты-мишени;
- доступность подходящей системы детекции.

Рассмотрим все эти факторы по порядку.

3.1.1. Безопасность

При работе с изотопно меченными зондами необходимо создать условия для безопасного захоронения использованных радиоактивных материалов. Персонал должен быть специально обучен методам работы с изотопами. Следует иметь в виду, что для получения радиоавтографов ^3H -меченных зондов необходимо от нескольких суток до нескольких недель, тогда как детекция в случае неизотопных молекул-свидетелей занимает всего 2–5 ч. ^{35}S -зонды более безопасны и требуют меньше времени для радиоавтографии, но все проблемы, связанные с захоронением радиоактивных материалов и обучением персонала, остаются. Тем не менее в некоторых случаях все-таки лучше использовать изотопные методы (гл. 5 и 7). Применение неизотопно меченных зондов, детектируемых гистохимическими методами, снимает вопрос о радиоактивном загрязнении, и если исходить только из соображений безопасности, то неизотопные молекулы-свидетели более удобны для повседневной работы. В качестве неизотопной метки используются различные соединения, но не все они одинаково безопасны [10]. Так, в процессе мечения ртутью образуется промежуточное соединение цианид ртути [11], а такая метка, как ацетиламинофлуорен, возможно, является канцерогеном [12]. Как показывает наш опыт, при рутинных определениях наиболее чувствительными и безопасными являются зонды, меченные биотинном и диоксигенином (см. ниже).

3.1.2. Чувствительность

Считается, что изотопно меченные зонды обеспечивают большую чувствительность, чем неизотопные, однако в последнее время разработаны методы, позволяющие выявлять уникальные гены как на метафазных хромосомах, так и в интерфазном ядре примерно с одинаковой чувствительностью с помощью зондов обоих

типов [4, 13]. Кроме того, метод неизотопной гибридизации *in situ* (НГИС) обладает более высоким разрешением при меньшем фоне [14]. Таким образом, при рутинных определениях он оказывается предпочтительнее, особенно при выявлении ДНК. Первой неизотопной молекулой-свидетелем был биотин (витамин Н), обладающий высоким сродством к природному белку авидину. Поскольку авидин является четырехвалентным белком, он способен связывать как минимум в два раза больше молекул биотина, чем антитела к биотину [15] и, таким образом, аффинный метод выявления биотина более чувствителен, чем иммуноцитохимический. Есть, правда, одно осложняющее обстоятельство: биотин входит в состав многих тканей (особенно высоко его содержание в печени), и использование биотинилированных зондов сопряжено с повышением фона, что затрудняет интерпретацию результатов гибридизации. По этой причине все чаще применяют другие молекулы-свидетели, такие как дигоксигенин (гл. 9), а чувствительность повышают другими способами, например совершенствуя систему детекции (см. ниже).

3.1.3. Характер зонда

Не все молекулы-свидетели удается включать в зонды любым из имеющихся методов (гл. 13), так что, выбирая молекулу-свидетеля, необходимо учитывать, какие методы мечения зонда можно будет использовать. Для мечения дигоксигенином и биотином подходит большое число методов, в частности в случае биотина возможно фотомечение. Что же касается изотопно меченных зондов, то спектр способов мечения здесь более ограничен.

3.1.4. Характер нуклеиновой кислоты-мишени

Для выявления ДНК методом ГИС обычно можно использовать неизотопно меченные зонды. Обнаружение мРНК — задача более сложная, и в настоящее время для этой цели чаще применяют изотопную ГИС. Более полно вопрос о выборе молекулы-свидетеля для выявления РНК рассмотрен в гл. 7 и 8.

3.1.5. Доступность подходящей системы детекции

Для детекции неизотопно меченных зондов используются гистохимические методы. Самый простой способ основан на мечении зонда флуорохромом или соответствующим ферментом. Однако такой метод малочувствителен, недостаточно гибок и используется сравнительно редко. Повысить его чувствительность можно, используя для мечения и детекции гаптены и антитела к

ним. При этом важно, что реактивы для иммунного и аффинного мечения легкодоступны и сравнительно дешевы. В табл. 4.1 приведены данные о методах детекции самых распространенных молекул-свидетелей. В случае биотина используется и ряд других методов; разработаны альтернативные методы для детекции дигоксигенина. Выбор системы детекции более подробно рассмотрен в разд. 3.8.

Таблица 4.1. Молекулы-свидетели и способы их детекции¹⁾

Свидетель	Система детекции	Источник
Биотин	Антитела—авидин	Langer et al., 1981 [15]
Дигоксигенин	Антитела	Herrington et al., 1991 [14]
Ртуть	Химические агенты—антитела	Hopman et al., 1986 [18]
Ацетиламинофлуорен	Антитела	Landegent et al., 1984 [19]
Сульфогруппы	Антитела	Morimoto et al., 1987 [17]
Ферменты	Прямое внесение	Matthews, Kricka, 1988 [20]

¹⁾ Используются и другие метки. Они подробно рассмотрены в работе [20].

3.2. Характер зонда и его мечение

После того, как молекула-свидетель выбрана, ее нужно включить в зонд. Методы мечения детально обсуждаются в гл. 13, здесь мы остановимся на них лишь вкратце. Существуют разные виды зондов и способы мечения, и окончательный их выбор определяется целями эксперимента.

3.2.1. Двухцепочечные ДНК-зонды

Эти зонды используются прежде всего для выявления ДНК [16], но могут применяться и для гибридизации с РНК [17]. Обычно они представляют собой бактериальные плазмиды со встроенной специфической последовательностью; методы амплификации и выделения таких плазмид описаны в гл. 13. Для мечения двухцепочечной ДНК используются два метода.

а. Ник-трансляция

Этот метод чаще всего применяется для выявления ДНК, поскольку соответствующие зонды легко получать и с ними удобно работать (протокол 4.1). Метод включает внесение в двухцепочечную ДНК случайных разрывов, в результате чего образуются меченые фрагменты разной длины с разным соотношением между векторной ДНК и вставкой. Предполагается, что такие фрагменты при отжиге соединяются друг с другом по перекрывающимся по-

следовательностям, образуя сеть, что приводит к усилению сигнала в месте локализации последовательности-мишени и повышению чувствительности метода [3]. Альтернативный метод состоит в рестрикционном вырезании зонда из плазмиды. Теоретически это предотвращает неспецифическое связывание вектора при гибридизации, но наш опыт показывает, что более высокую чувствительность обеспечивает мечение вектора с встроенным зондом, а не вырезанного зонда. Неспецифическое связывание вектора можно учесть, проведя соответствующий контрольный опыт (табл. 4.2).

Таблица 4.2. Контроли, использующиеся при гибридизации *in situ*

<i>Положительный контроль</i>	
1.	Ткань: используют ткань, заведомо содержащую нужную последовательность
2.	Методика: метят суммарную ДНК человека, чтобы убедиться в том, что все Компоненты системы работают
<i>Отрицательный контроль</i>	
1.	Ткань: используют ткань, заведомо не содержащую нужную последовательность (возможно при работе с вирусными ДНК и некоторыми геномными ДНК, например специфичными для Y-хромосомы повторами)
2.	Методика:
	а) мишень
	• нуклеиновую кислоту-мишень расщепляют с помощью ДНКазы или РНКазы (гл. 7)
	б) гибридизация
	• гибридизуют только с меченым вектором
	• гибридизуют с заведомо неподходящим меченым зондом (т. е. используют клонированный в том же векторе зонд для близкого подтипа вируса)
	• гибридизуют в присутствии избытка немеченого зонда
	• используют для выявления РНК смысловые зонды
	в) детекция
	• проводят гибридизацию без зонда
	• исключают первые антитела

Протокол 4.1. Ник-трансляция¹⁾

Наборы для ник-трансляции можно приобрести у нескольких фирм (например, Gibco BRL, UK). При работе с ними необходимо строго следовать рекомендациям фирмы-изготовителя. Для удаления невключившихся нуклеотидов мы используем переосаждение этанолом, но с равным успехом можно применять центрифугирование микроколонок.

Материалы

- ДНК для мечения
- Немеченые нуклеотиды, которые могут поставляться по отдельности (например, фирмой Sigma, UK) или в виде смеси (в наборах для ник-трансляции): для мечения биотином — по 0,2 мМ dCTP, dGTP, dTTP; для мечения дигоксигенином — по 0,2 мМ dCTP, dGTP, dATP
- Меченые нуклеотиды: дигоксигенин-11-dUTP (dig-dUTP, 1мМ; Boehringer Mannheim, Germany) или биотин-7-dATP (bio-dATP, 0,4 мМ; Amersham, UK)
- Смесь dig-dUTP/dTTP (1:2): ее можно приобрести у фирмы Boehringer Mannheim или приготовить самим, смешав 1 мМ растворы dig-dUTP и dTTP в объемном соотношении 1:2
- Ферменты: ДНК-полимераза I (5 ЕД/мкл), ДНКазы I
- Гликоген: 20 мг/мл
- 200 мМ ЭДТА, pH 8,0
- 3 М ацетат натрия, pH 6,0
- Абсолютный этанол
- Буфер ТЭ: 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА

Методика

1. Смешивают в микроцентрифужной пробирке на 0,5 мл следующие реактивы:

	<i>Биотин</i>	<i>Дигоксигенин</i>
• Плазмидная ДНК	1 мкг	1 мкг
• Немеченые нуклеотиды	5 мкл	5 мкл
• Смесь dig-dUTP/dTTP	—	1 мкл
• Bio-dATP	2,5 мкл	—
• ДНКазы I ²⁾	1–5 нг	1–5 нг

2. Доводят водой объем реакционной смеси до 49 мкл и инкубируют ее 2 мин при 37 °С.
3. Добавляют 1 мкл ДНК полимеразы I (5 ЕД/мкл) и инкубируют 150 мин при 15 °С.
4. Добавляют 5 мкл 200 мМ ЭДТА и прогревают реакционную смесь при 75 °С 10 мин для остановки реакции.
5. Добавляют 1 мкл гликогена.
6. Добавляют 1/10 объема 3 М ацетата натрия, pH 6,0, и 2 объема абсолютного этанола.
7. Инкубируют 20 мин в сухом льду или в течение ночи при –20 °С.
8. Центрифугируют в микроцентрифуге при 12 000 g 20 мин.

Протокол 4.1 (Продолжение)

9. Промывают осадок четыре раза 80% этанолом.
10. Осадок высушивают на лиофильной сушке и растворяют в 50 мкл буфера ТЭ.
11. Меченые зонды хранят при -70°C или 4°C . Если зонды хранятся при -70°C , их нельзя многократно замораживать и оттаивать.

¹⁾ При необходимости общий объем реакционной смеси можно увеличить, пропорционально увеличив объемы всех ее компонентов.

²⁾ Необходимое количество ДНКазы I определяют с помощью электрофореза фрагментированной ДНК в геле в щелочных условиях с последующим переносом по Саузерну, как описано в гл. 14. Стремятся к тому, чтобы средний размер фрагментов был равен 200–400 п.н.

6. Синтез, иницируемый рассеянной затравкой

Метод RPDS основан на случайной гибридизации гексамерных олигонуклеотидов с линеаризованной матрицей с последующей ферментативной элонгацией цепи путем присоединения меченых нуклеотидов. Образующийся зонд имеет варьирующую длину, а метку несет не только вставка, но и векторная ДНК. Получаемые таким образом зонды сходны с зондами, сконструированными методом ник-трансляции, но доля фрагментов небольшого размера выше, что может приводить к увеличению фона. Кроме того, перед мечением плазмиду необходимо перевести в линейную форму. Достоинством метода является то, что он позволяет достичь более высокого уровня мечения. Более полно метод RPDS рассмотрен в гл. 13. По нашему мнению, для обнаружения ДНК лучше использовать зонды, полученные методом ник-трансляции, поскольку они обеспечивают более высокую чувствительность.

3.2.2. Одноцепочечные ДНК-зонды

Одноцепочечную ДНК (оцДНК) можно получить из последовательностей, клонированных в нитчатых фагах типа M13 или в фагидах, активированных фаговой суперинфекцией, но при этом иногда возникают сложности с клонированием только одной из двух комплементарных цепей. Специфическое мечение одной цепи ДНК осуществляют с помощью рассеянной затравки или уникальных праймеров (гл. 13); при этом меченый зонд синтезируется в тех же количествах, что и немеченая ДНК-матрица, и перед гибридизацией нужно провести денатурацию зонда. Одноцепочечные ДНК-зонды применяются в опытах по гибридизации *in situ* весьма ограниченно.

3.2.3. Одноцепочечные РНК-зонды

В последние годы РНК-зонды (рибо-зонды) стали широко использоваться для выявления мРНК как при изотопной, так и при неизотопной ГИС (гл. 5, 7, 8). Это связано с более высокой стабильностью гибридов РНК—РНК по сравнению с гибридами РНК—ДНК и доступностью плазмидных векторов и векторов других типов, содержащих промоторы для РНК-полимераз. Мечение РНК-зондов проводят с помощью транскрипции *in vitro* (гл. 5, 7). Вкратце процесс сводится к следующему. В вектор по обе стороны от последовательности, которую нужно пометить, встраивают промоторы для РНК-полимераз бактериофагов и проводят инкубацию в присутствии меченых рибонуклеотидов. В результате синтезируются меченые РНК-фрагменты разной длины, но не больше заданной величины, такие, что в них отсутствуют последовательности, комплементарные вектору. Используя векторы, содержащие по разные стороны от сайта клонирования промоторы для разных РНК-полимераз, можно получить отдельно смысловые и антисмысловые зонды. Антисмысловой зонд комплементарен мРНК и гибридизуется с ней, а последовательность смыслового зонда идентична последовательности мРНК, и гибридизации не происходит. Отсутствие гибридизации со смысловым зондом можно считать отрицательным контролем. Возможность пометить рибо-зонды до высокой удельной активности и обработка препаратов РНКазой после гибридизации для расщепления негибридизовавшегося одноцепочечного РНК-зонда позволяет существенно снизить фон.

3.2.4. Олигонуклеотиды

Олигонуклеотиды широко используются для выявления мРНК, особенно в тех случаях, когда последняя присутствует в больших количествах (например, мРНК легкой цепи иммуноглобулинов в плазматических клетках [21]). Это самые короткие из используемых зондов и обычно их метят путем химического или ферментативного достраивания с одного или обоих концов мечеными нуклеотидами. Олигонуклеотидные зонды не дают столь высокой чувствительности, как зонды, помеченные с помощью ник-трансляции или рассеянной затравки, и для повышения чувствительности используют при гибридизации смесь примерно 20 разных олигонуклеотидов. Теоретически любые олигонуклеотиды в геноме человека длиной более 16 звеньев являются уникальными [22] и, следовательно, обеспечивают более специфичную гибридизацию. Кроме того, олигонуклеотидные зонды для любой секвенированной нуклеотидной последовательности или для

последовательностей, предсказанных исходя из соответствующих последовательностей аминокислот, можно быстро синтезировать с помощью автоматического синтезатора. Такие олигонуклеотиды применяют как по отдельности, так и в разных сочетаниях, но в последнем случае необходимо исследовать специфичность каждого олигонуклеотида, поскольку стабильность образующихся гибридов варьирует. Для мечения олигонуклеотидных зондов не подходит ни один из описанных выше методов, так как олигонуклеотиды нельзя клонировать или получить в двухцепочечной форме. В этом случае молекулы-свидетели включают в олигонуклеотид с помощью одного из четырех методов: концевого ферментативного включения, химического мечения, фотомечения, включения меченых нуклеотидов в ходе синтеза (гл. 13).

3.2.5. Зонды, получаемые при помощи ПЦР

Последнее время для получения меченых зондов стали применять ПЦР. Достоинство этого метода состоит в том, что метку можно ввести в зонд непосредственно в ходе ПЦР, без предварительного его клонирования. Кроме того, используя недавно разработанную модификацию ПЦР, так называемую обратную ПЦР, можно получить зонды и для фланкирующих исследуемую область неизвестных последовательностей [25]. Для синтеза и мечения одноцепочечных ДНК можно использовать ассиметричную ПЦР, проводимую при молярном отношении праймеров от 20:1 до 50:1. При этом образуется небольшое количество двухцепочечной меченой ДНК, и для синтеза только одноцепочечной ДНК необходим один праймер и большие количества матрицы. Выход синтезированного зонда при такой реакции намного меньше, чем при обычной ПЦР. Более подробно эти вопросы рассмотрены в гл. 13, а также в гл. 5, где описан метод получения с помощью ПЦР меченных диоксигенином и биотином зондов. Размер меченого зонда при эффективном неизотопном мечении составляет не более 1 т.п.н., и благодаря однородности образующихся меченых фрагментов они не гибридизуются между собой, как это происходит с ник-транслированными зондами.

3.3. Фиксация препаратов и подготовка предметных стекол

3.3.1. Фиксация

Обычно при проведении ГИС имеют дело или со свежими тканями, или с тканями, фиксированными формалином и залитыми в парафин. Таким образом, прежде чем приступить к анализу, не-

обходимо решить два вопроса: а) какие способы фиксации лучше использовать для свежих или замороженных тканей? б) как получить оптимальные результаты в случае залитой в парафин ткани? Считается, что нуклеиновые кислоты лучше всего сохраняются при фиксации в смеси спирта с кислотой, например в фиксаторе Карнуа [24]. Однако при этом страдает сама ткань. Поэтому срезы замороженных тканей до гибридизации обычно фиксируют в альдегидах; хранение и получение срезов замороженных тканей обсуждается в гл. 2. Как показывает наш опыт, фиксация с помощью альдегидов повышает чувствительность неизотопной ГИС при работе с клеточным материалом и замороженными тканями, особенно если сначала проводится фиксация в смеси спирта с кислотой. Этот подход позволяет максимально сохранить как нуклеиновые кислоты (за счет их преципитации), так и морфологию ткани (благодаря образованию сшивок).

Метод фиксации свежих клеток и замороженного материала описан в протоколе 4.2. Что касается архивных препаратов, то они уже фиксированы, так что для достижения наилучших результатов соответствующие процедуры необходимо модифицировать.

Протокол 4.2. Фиксация клеток и замороженных срезов

Материалы

- Фосфатно-солевой буфер (ФСБ): 10 мМ фосфатный буфер, 150 мМ NaCl, pH 7,2
- Метанол: уксусная кислота (3:1, о/о): в вытяжном шкафу смешивают 25 мл ледяной уксусной кислоты и 75 мл метанола и хранят смесь во льду не более 4 ч. Длительное хранение возможно при -20°C ¹⁾
- Параформальдегид (4%, в/о): растворяют 4 г параформальдегида (BDH, UK) в 100 мл ФСБ кипячением в конической колбе. Перед использованием охлаждают раствор во льду.
- ФСБ/глицин: 0,2% раствор (в/о) глицина в ФСБ.

Методика

1. Предметные стекла, на которые нанесены свежие клетки или замороженные срезы, на 10 мин помещают в смесь метанол : уксусная кислота (3:1). Можно также фиксировать клетки в суспензии до их нанесения на предметное стекло (гл. 9).
2. Переносят предметные стекла из смеси метанол : уксусная кислота в свежеприготовленный 4% раствор параформальдегида и инкубируют при комнатной температуре в течение 15 мин.

Протокол 4.2 (Продолжение)

3. Для модификации всех свободных альдегидных групп помещают стекла на 5 мин в раствор ФСБ/глицин.

4. Промывают стекла в ФСБ.

¹⁾ Раствор гигроскопичен, но гигроскопичность значительно уменьшается при снижении температуры до -20°C .

3.3.2. Предварительная обработка предметных стекол

С помощью гибридизации *in situ* можно исследовать срезы толщиной 3–10 мкм. Поскольку в ходе предварительной обработки срезов проводят ограниченный протеолиз, во избежание растрескивания срезов во время гибридизации *in situ* стекла обрабатывают различными адгезивными веществами ([8]; гл. 2). Как показывает наш опыт, наиболее эффективна обработка аминопропилтриэтоксисилоном; это дает возможность использовать высокие концентрации ферментов без потери клеточного материала [8]. Обработка покровных стекол органосилонами позволяет оптимизировать условия демаскирования срезов с сохранением морфологии клеток и тканей. Один из способов обработки предметных стекол описан в протоколе 4.3. Приготовленные таким образом стекла можно применять при работе с культурами клеток, срезами замороженных или залитых в парафин тканей.

Протокол 4.3. Обработка предметных стекол

Материалы

- Декон 90
- Аминопропилтриэтоксисилан (Sigma, UK)
- Ацетон

Методика

1. Предметные стекла помещают в держатель и промывают в предварительно нагретом до 60°C 2% (о/о) растворе декона 90 в дистиллированной воде.
2. Тщательно промывают стекла в дистиллированной воде и ацетоне и высушивают их на воздухе.
3. Помещают стекла на 30 мин в 2% (о/о) аминопропилтриэтоксисилан в ацетоне¹⁾.
4. Ополаскивают стекла в ацетоне, промывают в дистиллированной воде и высушивают на воздухе при 37°C .

5. Приготовленные таким образом стекла можно хранить при 22 °С сколь угодно долго, но адгезивные свойства у свежеприготовленных стекол (в первые 24 ч после обработки) значительно лучше.

¹⁾ Раствор можно использовать несколько раз; 600 мл достаточно для обработки 200 предметных стекол.

3.4. Предварительная обработка срезов

Предварительная обработка срезов включает:

- депарафинирование срезов тканей, залитых в парафин;
- демаскирование нуклеиновой кислоты-мишени;
- обработку РНКазой или ДНКазой;
- предгибридизацию срезов.

3.4.1. Депарафинирование

Из залитых в парафин архивных образцов необходимо удалить парафин. Для этого можно использовать обычные приемы, применяющиеся в гистологии, но наш опыт показывает, что нагревание срезов до их помещения в ксилол улучшает гибридизацию. Метод депарафинирования описан в протоколе 4.4.

3.4.2. Демаскирование нуклеиновых кислот

В клетках и тканях нуклеиновая кислота-мишень находится в контакте с другими клеточными компонентами и при фиксации альдегидами оказывается сшитой с другими нуклеиновыми кислотами и связанными с ними белками. Перед гибридизацией эти пришитые компоненты необходимо удалить, чтобы облегчить доступ зонда к нуклеиновой кислоте-мишени. При этом нужно стараться сохранить достаточное количество клеточного материала, с тем чтобы не нарушить морфологию тканей и клеток, избежать разрушения среза и потери последовательности-мишени. В случае тканей, фиксированных только в смеси спирт/кислота, демаскирование не требуется. Для демаскирования проводят ограниченный протеолиз, подбирая в каждом случае условия опытным путем. Наиболее широко используются два фермента: протеиназа К и пепсин-HCl, но применяют и другие ферменты, например проназу [25]. Первый из этих ферментов особенно часто используют для демаскирования вирусной ДНК, заключенной в белковую оболочку [8], а второй менее эффективен при анализе

вирусных ДНК, но более удобен при проведении анализа РНК и геномной ДНК [26]. Протеолитическую обработку разных тканей проводят при разной концентрации фермента. Так, в случае замороженных срезов концентрация протеиназы К составляет 1–2 мкг/мл, а при работе с залитыми в парафин срезами используют тот же фермент в концентрации 500 мкг/мл. От качества демаскирования нуклеиновых кислот зависят воспроизводимость результатов ГИС и чувствительность метода, поэтому, подобрав определенный фермент, нужно с ним и работать. Максимальная концентрация фермента ограничивается необходимостью сохранения морфологии клеток и тканей, а также целостности среза. Для оптимизации условий гибридизации нужно обработать предметные стекла органосиланом (протокол 4.3), подобрать фермент и его концентрацию.

3.4.3. Обработка ДНКазой или РНКазой

Нуклеазная обработка срезов перед гибридизацией решает две задачи. Во-первых, удаление нуклеиновой кислоты-мишени обеспечивает отрицательный контроль (см. табл. 4.2). Во-вторых, при обработке РНКазой повышается специфичность гибридизации ДНК–ДНК, а при обработке ДНКазой — специфичность анализа РНК. Это особенно важно при изучении экспрессии вирусных генов, когда вирусная ДНК в клетке представлена большим числом копий. Более подробно использование РНКаз и ДНКаз обсуждается в гл. 5, 7 и 8.

3.4.4. Предгибридизация срезов

Многие экспериментаторы после демаскирования нуклеиновых кислот перед гибридизацией инкубируют срезы в не содержащей зонда гибридизационной смеси, по аналогии с тем, как это делается при гибридизации на фильтрах (гл. 14). Наш опыт и опыт других авторов (гл. 5 и 8) говорит, что этот этап не является обязательным при выявлении вирусной ДНК, геномной ДНК и мРНК с помощью неизотопных методов. Однако при работе с радиоактивно мечеными зондами предгибридизация бывает необходима (гл. 7).

Некоторые варианты ГИС включают дополнительные процедуры, например ацетилирование и обработку кислотой. Однако они не оказывают существенного влияния на результаты, и подробное описание отдельных модификаций метода ГИС дано в тех главах, где рассматривается использование ГИС для решения конкретных задач.

Протокол 4.4. Депарафинирование срезов и демаскирование нуклеиновых кислот

Материалы

- Протеиназа К (Boehringer Mannheim) или пепсин-HCl (Sigma, UK)
- ФСБ (см. протокол 4.1)
- Чашки Тераки (Gibco, UK)

Методика

А. Депарафинирование

1. Из парафиновых блоков делают срезы толщиной 5 мкм и помещают их на подготовленные по описанному в протоколе 4.3 методу предметные стекла.
2. Прогревают срезы в течение ночи при 60 °С или в течение 45 мин при 75 °С. Далее срезы можно хранить при комнатной температуре.
3. Чтобы расплавить парафин, срезы прогревают в течение 15 мин при 75 °С.
4. Промывают срезы в ксилоле при комнатной температуре два раза по 5 мин.
5. Удаляют ксилол, промывая срезы в 99% (технически чистом) этаноле (три раза по 5 мин при комнатной температуре)¹⁾.
6. Промывают срезы в дистиллированной воде. Если не предполагается использовать срезы немедленно, то их высушивают на воздухе²⁾.

Б. Демаскирование

Для демаскирования нуклеиновых кислот используют или протеиназу К, или пепсин-HCl.

Протеиназа К

1. Растворяют лиофилизированную протеиназу К в ФСБ до концентрации 500 мкг/мл (парафиновые срезы) или 1 мкг/мл (замороженные срезы, подготовленные, как это описано в протоколе 4.2).
2. Заливают приготовленным раствором срезы, помещенные в чашки Тераки, и помещают эти чашки на 15 мин в предварительно нагретую до 37 °С водяную баню.
3. Промывают срезы в дистиллированной воде и высушивают их на воздухе при 75 °С³⁾.

Протокол 4.4 (Продолжение)

Пепсин-HCl

1. Нагревают до 37 °C 96 мл дистиллированной воды.
2. Растворяют в этой воде 100 мг пепсина.
3. К полученному раствору при осторожном перемешивании добавляют 4 мл 5 М HCl.
4. В этом растворе в химическом стакане инкубируют срезы при 37 °C в течение 15 мин.
5. Промывают срезы в дистиллированной воде и высушивают их на воздухе при 75 °C¹⁾.

¹⁾ При переводе среза в водную фазу можно провести его через батарею спиртов (99%, 70%, 50%), но мы не считаем это необходимым.

²⁾ Депарафинированные срезы можно хранить при комнатной температуре сколь угодно долго.

³⁾ После демаскирования срезы можно хранить при комнатной температуре в течении как минимум 6 мес.

3.5. Денатурация и гибридизация

3.5.1. Денатурация

Необходимость в денатурации определяется типом зонда и нуклеиновой кислоты-мишени. Если объект исследования — двухцепочечная ДНК и используется двухцепочечный зонд, необходимо денатурировать обе молекулы [27, 28]. Денатурировать одноцепочечную мРНК и рибо-зонды нет необходимости, но на самом деле денатурация приводит к усилению сигнала — возможно, в результате разрушения вторичной структуры (гл. 8). Для денатурации используют как химические, так и физические методы. Так, при гибридизации на фильтрах обычно проводят щелочную денатурацию, однако (особенно при неизотопной ГИС) такая денатурация может вести к разрушению эфирной связи между нуклеотидом и молекулой-свидетелем. Поэтому мы вместо химической используем термоденатурацию, нагревая образец или обычным способом, или в микроволновой печи. Денатурацию зонда и нуклеиновой кислоты-мишени можно проводить отдельно (как в случае гибридизации нуклеиновых кислот с иммобилизованной на фильтре ДНК) или зонд можно добавить к срезу до денатурации, а затем одновременно денатурировать и зонд, и последовательность-мишень. Последний метод обычно применяют при ГИС ДНК—ДНК, но он столь же эффективен и при анализе мРНК. Денатурацию обычно проводят в присутствии формамида и солей. Формамид ослабляет внутримолекулярные водородные

связи в зонде и в последовательности-мишени [29], что позволяет снизить температуру денатурации и гибридизации. Проще всего одновременно денатурировать зонд и последовательность-мишень путем добавления зонда к мишени в соответствующей реакционной смеси (протокол 4.5).

3.5.2. Гибридизация и определение жесткости ее условий

Если зонд и последовательность-мишень денатурируют одновременно, то для проведения гибридизации достаточно просто снизить температуру смеси ниже температуры плавления гибрида зонд/мишень и в этих условиях выдержать образец в течение 2–16 ч.

а. Жесткость условий гибридизации

При однофазной гибридизации (т. е. при гибридизации в растворе) оптимальная температура ренатурации примерно на 25 °C ниже температуры плавления (T_m) гибридной молекулы. T_m двухцепочечной молекулы ДНК — это температура, при которой 50% дуплексов денатурировано; она зависит от GC-содержания дуплекса, его длины в парах нуклеотидов (L), концентрации моновалентных катионов (M) и содержания в реакционной смеси формамида (F). Зависимость T_m от этих параметров можно описать с помощью формулы, полученной на основании экспериментов по ренатурации ДНК в растворе [24, 25]:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log M + 0,41 (\%GC) - 0,72F - 650/L.$$

В случае гибридов с неправильным спариванием необходимо скорректировать формулу. Степень ренатурации зависит от условий гибридизации и отмывания образца. Температура плавления несовершенных дуплексов (T'_m) ниже T_m полностью комплементарных гибридов и оценивается по формуле

$$T'_m = T_m - \alpha (\% \text{ некомплементарных нуклеотидов}),$$

где α варьирует от 0,5 до 1,4 °C. Точная ее величина зависит от нуклеотидной последовательности гибридной молекулы, поскольку некомплементарность в GC-богатых участках приводит к большему снижению T_m , чем в AT-богатых: для poly(AT) $\alpha = 0,5$, для poly(GC) — 1,4, а для большинства других последовательностей α находится между этими двумя значениями. В результате, если гибридизацию проводить при температуре между T_m и T'_m , то не полностью комплементарные последовательности гибридизоваться не будут. Напомним, однако, что скорость отжига максимальна при

температуре $T_m - 25^\circ\text{C}$ и уменьшается по мере приближения к T_m . Таким образом, нужно пойти на некий компромисс, в результате которого общепринятые «жесткие» условия (гибридизация в 50% формамиде, $2 \times \text{SSC}$ при $37-42^\circ\text{C}$) будут соответствовать температуре от $T_m - 12$ до $T_m - 19^\circ\text{C}$. В этих условиях отжиг идет достаточно быстро, но для гибридов, комплементарных менее чем на 83–88% (при $\alpha = 1$), гибридизация отсутствует. Более жесткие условия создают, отмывая препарат после гибридизации при температуре, более близкой к T_m (разд. 3.6).

При дальнейшем обсуждении условий проведения неизотопной ГИС речь будет идти о зондах, полученных методом нуклеотидной транскрипции, и о парафиновых срезах.

До сих пор мы считали, что нуклеиновые кислоты в тканях и клетках ведут себя точно так же, как в растворе, что не соответствует действительности. Например, цитоскелет затрудняет диффузию зонда к последовательности-мишени; есть и другие ограничивающие подвижность факторы. В тканях, фиксированных альдегидами, диффузия еще более замедляется вследствие образования сшивок между нуклеиновыми кислотами и между нуклеиновыми кислотами и белками. Поскольку неизотопная ГИС широко используется для исследования фиксированных в формалине архивных препаратов, ясно, как важно учитывать любые отклонения от поведения нуклеиновых кислот в растворе. Так, денатурацию в фиксированных альдегидами тканях или клетках в $2 \times \text{SSC}$ и 50% формамиде нужно проводить при температуре $90-95^\circ\text{C}$, хотя из приведенных выше формул получается T_m , равное 58°C (при GC-содержании 50%). Такие различия характерны именно при альдегидной фиксации; при фиксации клеток в смеси спирт/кислота денатурацию проводят при более низкой температуре.

Возможность с помощью ГИС различать близкородственные последовательности можно оценить, используя уравнения, описывающие кинетику ренатурации нуклеиновых кислот в растворе. Однако в любом случае конечная цель анализа состоит в том, чтобы доказать наличие или отсутствие гибридизации независимо от того, удовлетворяют ли экспериментальные условия ее проведения тем, которые используются при математическом анализе кинетики ренатурации в растворе. Эти условия необходимо подбирать опытным путем, ставя контрольные опыты, позволяющие исключить перекрестную гибридизацию между родственными последовательностями. Особенно важно это при выявлении вирусных ДНК, для которых был опытным путем определен «тканевой эквивалент» T_m (T_m^I) (см. [9] и гл. 9).

Более полное описание процесса гибридизации и влияющих на него факторов можно найти в книге [13]. Один из вариантов проведения гибридизации описан в протоколе 4.5. Использованные там условия (50% формамид, $2 \times \text{SSC}$, 42°C) соответствуют температуре гибридизации $T_m - 12^\circ\text{C}$ [25]. Жесткость условий можно повысить, увеличив концентрацию формамида, снизив концентрацию солей и повысив температуру. Однако по причинам, изложенным в разд. 3.6, удобнее регулировать жесткость в процессе отмывания препарата после гибридизации: это позволяет более четко различать близкородственные последовательности.

б. Время гибридизации

Время гибридизации зависит от скорости процесса и полноты гибридизации, которой необходимо достичь. Скорость, в свою очередь, зависит от концентрации зонда и последовательности-мишени, и — в случае гибридизации с ДНК-мишенями — процесс может остановиться в результате самоассоциации мишени. Отжиг высокоповторяющихся последовательностей происходит быстро, и время гибридизации может быть небольшим. Так, при высоком титре вируса (гл. 5 и 9) и выявлении хромосомоспецифичных высокоповторяющихся последовательностей для гибридизации достаточно двух часов. Для низкокопийных последовательностей процесс занимает гораздо больше времени, в некоторых случаях до 40 ч, но обычно гибридизацию проводят в течение ночи. Оптимальное время подбирают опытным путем, используя для каждой комбинации зонд/мишень свои положительные и отрицательные контроли.

3.5.3. Гибридизационная смесь

В состав гибридизационной смеси входят две группы компонентов: абсолютно необходимые и те, без которых можно обойтись.

а. Необходимые компоненты

К числу необходимых компонентов относятся моновалентные катионы (обычно ионы натрия), декстрансульфат, гибридизационный буфер и меченый зонд. Концентрация моновалентных катионов и формамида определяется жесткостью условий гибридизации (разд. 3.5.2), а применение декстрансульфата связано с тем, что за счет молекулярного вытеснения он увеличивает эффективную концентрацию зонда; для достижения максимального эффекта используют декстрансульфат с мол. массой более 8000. Меченый зонд должен иметь подходящий размер и присутство-

вать в нужной концентрации. Если зонд будет слишком большим, он не сможет проникнуть через клеточный матрикс даже после протеолитической обработки. Мы считаем, что оптимальный размер зондов, полученных методом ник-трансляции, — 200–400 п.н. При меньшей длине повышается уровень фоновой гибридизации вследствие неспецифической абсорбции зонда клеточными структурами. Подбирая концентрацию зонда, необходимо соблюдать баланс между временем и полнотой гибридизации, с одной стороны, и отношением сигнал/шум, с другой. При этом необходимо учитывать, что гибридизация зонда с последовательностью-мишенью — это реакция второго порядка, но в случае гибридизации с ДНК-мишенями на нее накладывается отжили последовательности-мишени самой на себя. В результате при повышении концентрации зонда до 1–2 нг/мкл происходит насыщение как при анализе мРНК [30], так и при анализе ДНК [31]. В то же время неспецифическое связывание зонда происходит без насыщения, и, таким образом, оптимальной является концентрация зонда, при которой наблюдается насыщение специфической гибридизации. Обычно мы работаем при концентрации 2 нг/мкл; при меньших концентрациях существенно снижается чувствительность метода.

б. Обязательные компоненты

Для уменьшения неспецифической гибридизации в гибридизационную смесь иногда добавляют избыточное по отношению к зонду количество немеченой ДНК человека (зонды вирусного происхождения) или ДНК спермы лосося (если в качестве зонда используется геномная ДНК человека) (гл. 9), а также другие вещества, например фиколл и поливинилпирролидон. Их применение определяется условиями конкретного эксперимента, которые мы обсудим в соответствующих разделах.

Протокол 4.5. Денатурация и гибридизация

Материалы

- Формамид
- Ионообменная смола Bio-Rad AG501-X8, 20–50 меш
- Декстрансульфат
- 20 × SSC: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0
- Меченый зонд (протокол 4.1)
- Буфер ТЭ (протокол 4.1)
- Чашки Тerasaki (Gibco/Nunc, UK)

Методика

А. Приготовление гибридизационного буфера (ГБ)

1. Деионизируют формамид, перемешивая в течение 45 мин 50 мл формамида с 5 г ионообменной смолы. Затем дважды профильтровывают формамид через бумажный фильтр ватман № 1 и хранят его порциями при -20°C .
2. Смешивают:

• деионизованный формамид	5 мл
• 50% (в/о) декстрансульфат	1 мл
• $20 \times \text{SSC}$	1 мл
3. Доводят pH буфера до 7,0 с помощью 5 М HCl и хранят его при 4°C .

Б. Денатурация и гибридизация

1. На каждые 7 мкл ГБ добавляют 10–20 нг меченого зонда.
2. К получившейся гибридизационной смеси (ГС) можно добавить те компоненты, которые не являются необходимыми для гибридизации¹⁾.
3. К полученной ГС добавляют ТЭ, доведя ее объем до 10 мкл на каждые 7 мкл исходного ГБ.
4. На каждый срез капают от 5 до 20 мкл полученной смеси.
5. Покрывают срез покровным стеклом.
6. Помещают стекла со срезами в чашки Тerasaki (по 2 среза в чашку).
7. Проводят денатурацию либо в вентилируемом сушильном шкафу при 95°C в течение 15 мин, либо в микроволновой печи. Время денатурации в последнем случае подбирают для каждой печи опытным путем.
8. Проводят гибридизацию в суховоздушном термостате при 42°C в течение 2–16 ч.

¹⁾ Детальное описание этих компонентов приведено в гл. 5–9.

3.6. Отмывание образцов после гибридизации и ингибирование эндогенной ферментативной активности

Образец отмывают после гибридизации для того, чтобы:

- удалить негибридизовавшийся зонд;
- блокировать неспецифическое связывание антител и неспецифическую ферментативную активность;
- ужесточить условия гибридизации.

Для решения первой задачи срезы промывают такими растворами, в которых образовавшиеся гибриды между зондом и последовательностью-мишенью остаются стабильными. Обычно это SSC-буфер в высокой концентрации с нейтральным рН (протокол 4.6). Неспецифическое связывание компонентов, входящих в систему детекции, блокируют разными способами, например с помощью бычьего сывороточного альбумина (БСА) или антисывороток животных. Для облегчения диффузии антител в препарате последний инкубируют в растворе, содержащем небольшое количество детергентов. Таким образом, принципы блокирования неспецифического связывания аналогичны используемым в иммуноцитохимии. Для ингибирования эндогенных ферментов применяют разные методы. Чаще всего проводят ферментативную обработку и тепловую денатурацию, но иногда при анализе архивных препаратов с использованием систем детекции на основе щелочной фосфатазы/пероксидазы применяют другие методы. Если возникают проблемы, связанные с наличием в тканях эндогенной щелочной фосфатазы, обычно вводят в ферментный субстрат левамизол (протокол 4.7). При анализе тканей с большим содержанием эритроцитов, в том случае, если в системе детекции используется пероксидаза, может наблюдаться повышенный фон. В такой ситуации блокируют эндогенную пероксидазу с помощью методов, описанных в разд. 5.2 гл. 2 и в протоколе 9.2. Последний метод особенно удобен при анализе мазков и биоптатов шейки матки.

Жесткость условий гибридизации уже частично задается условиями самой реакции (разд. 3.5). Однако она определяется не только величиной T_m , но и диффузией зонда к последовательности-мишени и возможностью начала гибридизации. Эти факторы несут существенны для отмывания после гибридизации, и жесткость на этом этапе зависит только от T_m . Условия легко ужесточить, проводя отмывание в растворах, где стабильность гибридов зонд/мишень уменьшается до уровня, когда сохраняются только гибриды с нужной степенью гомологии. Для этого уменьшают концентрацию моновалентных катионов (ионов натрия), повышают концентрацию формамида и/или температуру отмывания. Необходимо отметить, что жесткость при отмывании возрастает только тогда, когда использующиеся для ее проведения растворы дестабилизируют гибриды зонд—мишень сильнее самой гибридизационной смеси. По аналогии с гибридизацией в растворе величину T_m^I можно определить при ступенчатом увеличении жесткости условий отмывания до полного исчезновения гибридизационного сигнала. Ясно, что это будет каждый раз какая-то своя T_m^I

(разд. 3.5), так что при любом сочетании условий гибридизации и отмывании ее нужно определять опытным путем, используя хорошо характеризованные последовательности-мишени ([9] и гл. 9).

Протокол 4.6. Отмывание препаратов после гибридизации

Материалы

- 4 × SSC (см. протокол 4.1)
- Формамид
- Трис-солевой буфер (ТСБ): 50 мМ трис-НCl, pH 7,2, 100 мМ NaCl
- БСА: фракция V, химически чистый
- Тритон X-100

Методика

1. Промывают срезы два раза по 5 мин при комнатной температуре в 4 × SSC.
2. Промывают срезы в течение 30 мин при определяемой условиями эксперимента температуре в формамидно-солевой смеси (например, в 50% формамиде/0,1 × SSC)¹⁾, обеспечивающей жесткие условия.
3. Промывают срезы 5 мин при комнатной температуре в 4 × SSC.
4. Инкубируют срезы 30 мин в ТСБ, содержащем 5% (в/о) БСА и 0,05% (о/о) тритон X-100. В зависимости от характера эксперимента можно использовать и другие антисыворотки.

¹⁾ Отмывание в жестких условиях проводят в том случае, когда необходимо разграничить высокоомологичные последовательности, например нуклеиновые кислоты близкородственных подтипов вирусов. Более детально такие эксперименты описаны в [9].

3.7. Детекция гибридизовавшегося зонда

Гибридные молекулы мишень/зонд при использовании изотопно меченных зондов выявляют радиоавтографическим методом. Этот метод подробно рассматривается в гл. 5 и 7 и здесь мы на нем останавливаться не будем. Для выявления неизотопно меченных зондов применяют те же подходы, что и в иммуноцитохимических исследованиях (гл. 2), но детали соответствующих методов существенно различаются. Выбирая метод детекции, необходимо ответить на два вопроса: а) какой раствор использовать для инкубации? б) на какой системе детекции остановиться? Как показывает наш опыт, оптимальное отношение сигнал/шум достигается

при инкубации срезов и клеток в растворах антител, содержащих те же реактивы (детергенты и животные белки), которые использовались для блокирования неспецифического связывания. Кроме того, неспецифическое окрашивание ядер авидином можно существенно уменьшить инкубацией конъюгатов авидина с ферментами в растворе, содержащем обезжиренное сухое молоко [32]. Рекомендуется также проводить отмывание при высоких рН и концентрации солей [33]. Однако при высокой ионной силе уменьшается стабильность комплекса антиген—антитело, и этот способ можно применять только в системах с одноступенчатой детекцией авидина. Отмывание при высоких рН тоже нельзя считать универсальным подходом. Выбирая систему детекции, в первую очередь надо решить вопрос о том, флуоресцентные или нефлуоресцентные методы будут использоваться. Флуоресцентные системы обладают высокой чувствительностью и большей разрешающей способностью (особенно при исследовании отдельных клеток; см. гл. 6), но они слишком сложны для повседневной работы в клинической лаборатории или для исследования архивных залитых в парафин препаратов. Кроме того, флуоресцентные микроскопы очень дороги, а большинство флуоресцентных меток даже при их стабилизации с помощью различных ингибиторов выцветают под действием света с определенной длиной волны. Подробно флуоресцентные системы детекции рассмотрены в гл. 2 и 6. В отличие от этого, применение нефлуоресцентных систем сопряжено с незначительной модификацией используемых в иммуноцитохимии методов. Окрашенные продукты реакции стабильны и их легко анализировать с помощью обычной световой микроскопии. Таким образом, в повседневной практике лучше использовать методы, не требующие применения изотопно или флуоресцентно меченных зондов. Самой простой системой детекции является одноступенчатая с использованием конъюгатов антител или авидина с ферментом-индикатором. Усилить сигнал можно либо наслаиванием антител, либо применением комплексов фермент—антитело, повышающих количество фермента, связывающегося с каждой молекулой-свидетелем [34, 35]. В методах, основанных на использовании авидин-биотинового комплекса (ABC), применяют оба способа усиления сигнала [36]. Большинство описанных методов легко модифицировать для выявления других молекул-свидетелей, используя соответствующие первые антитела; это позволяет создавать гибкие, обладающие разной чувствительностью системы детекции. В качестве примера в протоколе 4.7 детально описана одна из таких систем, а на рис. 4.2



Рис. 4.2. Биоптат остроконечной кондиломы; гибридизация с биотин-меченным HPV6-зондом. Гибридивовавшиеся последовательности выявля-ли с помощью описанного в протоколе 4.7 метода при малом (*А*) и боль-шом (*Б*) увеличении. Обратите внимание на гибридизационный сигнал в ядрах парабазальных клеток (стрелка на рис. *Б*). Стрелки на рис. *А* — базальный слой.

приведены полученные с ее помощью результаты. Более подробно особенности различных систем детекции будут рассмотрены в гл. 5–9, а описанные в гл. 2 иммуноцитохимические методы можно применять и при ГИС, заменив первые антитела антителами к молекуле-свидетелю.

Протокол 4.7. Детекция зондов и монтирование срезов

А. Детекция биотинилированных зондов

Здесь описан метод одноступенчатой детекции с использованием конъюгата авидина с пероксидазой или щелочной фосфатазой. Другие варианты детекции таких зондов рассмотрены в гл. 5–9.

Материалы

- Буфер ТСБ или ТБТ (протокол 4.6)
- Конъюгат авидина с щелочной фосфатазой (ЩФ) или пероксидазой хрена (ПХ) (Dako, UK)

Методика

1. Срезы инкубируют 30 мин при 22 °С в разведенном в ТБТ (1:100) конъюгате авидина с ЩФ или ПХ.
2. Отмывают несвязавшийся конъюгат два раза по 5 мин в ТСБ.
3. Инкубируют срезы в субстрате для ЩФ или пероксидазы (см. ниже).
4. Чтобы остановить реакцию, промывают срезы в дистиллированной воде в течение 5 мин.
5. Высушивают срезы на воздухе при 42 °С, окрашивают их и монтируют в глицериновом желе¹⁾.

Б. Приготовление субстрата²⁾

Многие субстраты для рутинных определений можно приобрести в виде соответствующих наборов (например, набор АЕС фирм Dako, UK, или Zymed, USA).

Нитросиний тетразолий (НСТ)/5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (БХИФ) (субстрат для ЩФ)

Материалы

- Буфер для субстрата: 50 мМ трис-НСl, 100 мМ NaCl, 1 мМ MgCl₂, pH 9,5
- 1 М левамизол в дистиллированной воде (не обязателен)
- Диметилформамид (ДМФ)
- НСТ и БХИФ

Методика

1. 30 мл буфера для субстрата прогревают при 37 °С.
2. 10 мкг НСТ растворяют в 200 мкл ДМФ и к полученному раствору добавляют 1 мл подогретого буфера для субстрата.
3. Полученную смесь по каплям добавляют к остальному подогретому буферу для субстрата.
4. 5 мкг БХИФ растворяют в 200 мкл ДМФ и медленно вливают полученный раствор в буфер для субстрата.
5. При необходимости в полученный буфер добавляют левамизол до конечной концентрации 0,1 мМ³⁾.
6. Разливают порциями по 4 мл и хранят при –20 °С.

3-амино-9-этилкарбазол (АЭК)/пероксид водорода (H₂O₂) (субстрат для пероксидазы)

Этот субстрат должен быть свежеприготовленным.

Материалы

- 20 мМ ацетатный буфер, pH 5,2
- АЭК и 30% H₂O₂

Методика

1. 2 мг АЭК растворяют в стеклянной пробирке в 1,2 мл диметилсульфоксида.
2. Полученный раствор вливают в 10 мл 20 мМ ацетатного буфера, pH 5,0–5,2.
3. Непосредственно перед использованием к раствору субстрата добавляют 1 мкл 30% (о/о) H₂O₂. Возможно, полученный раствор придется профильтровать.

В. Глицериновое желе

Материалы

- Желатина
- Глицерин
- Фенол

Методика

1. 10 г желатины растворяют в 60 мл дистиллированной воды в водяной бане (37 °С) или на магнитной мешалке с подогревом.
2. К полученному раствору добавляют 70 мл глицерина и 0,25 г фенола.

Протокол 4.7 (Продолжение)

3. Получившееся желе хранят при комнатной температуре (желе затвердевает) или при 42 °С (желе остается мягким). Необходимо отметить, что при монтировании срезов на этом желе происходит удаление водорастворимых красителей.

¹⁾ Выбор метода монтирования срезов зависит от конкретного сочетания субстрата и способа окрашивания. Так, монтирование в присутствии органических растворителей нельзя проводить в случае сочетаний НСТ/БХИФ—ЩФ, АЭК—пероксидаза. Однако подобные растворители вполне приемлемы для работы с такими субстратами, как диаминобензидин (пероксидаза) и нафтол/новый фуксин (ЩФ).

²⁾ Другие субстраты детально описаны в гл. 2.

³⁾ Левамизол ингибирует эндогенную ЩФ.

4. Контроли

Чтобы убедиться в специфичности наблюдаемого сигнала, во всех случаях необходимо ставить адекватные контрольные опыты, как положительные, так и отрицательные (табл. 4.2).

4.1. Положительные контроли

Положительные контроли аналогичны используемым в иммуноцитохимии (гл. 2). Их можно разделить на две категории: тканевой контроль и контроль собственно метода. Так, в специфичности зонда позволяет убедиться гибридизация с тканью, заведомо содержащей искомую последовательность. При этом лучше использовать ткани, в которых интересующая исследователя ДНК или РНК присутствует в умеренных количествах: определяя величину гибридизационного сигнала на контрольном срезе, таким способом можно оценить чувствительность метода. Последняя может снижаться при слабом мечении нуклеиновой кислоты-зонда или недостаточном демаскировании последовательностей-мишеней. Чтобы убедиться в нормальном ходе денатурации и гибридизации, можно использовать в качестве зонда суммарную геномную ДНК человека.

4.2. Отрицательные контроли

Этих контролей больше, чем положительных, и с их помощью (табл. 4.2) можно проверить все этапы представленного на рис. 4.1 метода. В них обычно не применяют ткани, вообще не содержащие последовательность-мишень, поскольку условия гибридизации в столь разных тканях существенно различаются и прямое сравнение

полученных результатов будет некорректным. Для определения специфичности полезно обрабатывать последовательности-мишени ДНКазой или РНКазой; мы рекомендуем применять эту процедуру в повседневной практике. Гибридизация с меченым вектором такого же размера, как зонд, позволит исключить возможную неспецифическую гибридизацию вектора с исследуемой тканью, а гибридизация с гомологичными (но не идентичными) зонду последовательностями — оценить специфичность и жесткость используемых условий гибридизации. Более подробно этот способ контроля мы обсудим в разд. 7.3 гл. 9, где рассматриваются методы обнаружения вируса папилломы человека. Проводя гибридизацию «положительных» срезов со смесью меченого и немеченого зондов при 1000-кратном избытке последнего, можно оценить специфичность гибридизации по конкуренции зондов обоих типов за последовательность-мишень. Если конкурентная гибридизация идет, то при большом избытке немеченого зонда будет наблюдаться существенное ослабление гибридизационного сигнала или полное его исчезновение. Это указывает не только на идентичность зонда последовательности-мишени, но в первую очередь на то, что условия гибридизации обеспечивают необходимую специфичность. При постановке такого контроля важно использовать ник-трансляцию (но без метки) и для получения немеченого зонда — в результате спектр размеров у обоих зондов будет совпадать и условия их гибридизации будут одинаковыми. Если немеченый зонд будет слишком большого размера, он не сможет успешно конкурировать с меченым зондом и подавлять его гибридизацию. При ГИС с РНК для контроля специфичности гибридизационного сигнала применяют смысловые зонды (подробнее об этом см. в гл. 7 и 8). Контроль системы детекции проводится так же, как в иммуноцитохимии (гл. 2).

5. Возможные причины неудач

Далее мы остановимся на проблемах, возникающих при проведении неизотопной ГИС. Иммунохимические методы детекции рассматривались в гл. 2, а проблемы, связанные с детекцией изотопно меченных зондов, мы обсудим в гл. 5 и 7.

5.1. Растрескивание срезов или нарушение морфологии тканей

Сохранность срезов на предметных стеклах определяется соотношением между величиной адгезии, зависящей от предварительной обработки предметных стекол, и степенью разрушения белков меж-

клеточного матрикса в ходе протеолиза, которая частично зависит от характера изучаемой ткани. Таким образом, растрескивание срезов можно уменьшить, либо увеличив адгезию, либо проводя протеолиз в более мягких условиях. Мы покрываем все предметные стекла аминопропилтриэтоксисиланом (см. ранее), а также изменяем условия демаскирования — либо используем другой фермент, либо уменьшаем концентрацию фермента. Все это, однако, может приводить к снижению чувствительности метода. Нарушение морфологии тканей обычно происходит в результате либо чрезмерного протеолиза срезов, либо слишком сильного их нагревания при денатурации.

5.2. Слабый сигнал или полное его отсутствие

Отсутствие сигнала в случае положительного контроля может обуславливаться разными факторами — от недостаточного мечения зонда до случайного пропуска этапа инкубации с антителами. Если сигнал слабый, значит, метод в принципе работает, но один или несколько его этапов не оптимизированы. Например, зонд может быть недостаточно хорошо помечен или иметь слишком большой размер и плохо проникать в клетку. Среди других причин слабого сигнала необходимо отметить неадекватное демаскирование, недостаточную денатурацию, низкое качество антител. Как показывает наш опыт, чаще всего имеет место неадекватное демаскирование, обусловленное или спонтанной инактивацией фермента при его хранении, или различием в активности ферментов из разных партий. Если сигнал слишком слабый, мы прежде всего проверяем уровень мечения зонда и его размер и, убедившись, что с этим все в порядке, повторяем эксперимент с другой партией демаскирующего фермента. Если сигнал остается слабым, мы проверяем на контрольных материалах все антитела, как это описано в гл. 2.

5.3. Невоспроизводимость результатов

Невоспроизводимость положительного результата гибридизации может иметь две причины: либо первый эксперимент дал ложноположительный результат, либо второй эксперимент оказался неудачен в чисто техническом отношении. Для исключения второй причины каждый эксперимент необходимо сопровождать соответствующими контролями, и если обнаружится, что результат не воспроизводится по техническим причинам и при повторных опытах сигнал опять отсутствует или является очень слабым, то следует вернуться к комментариям в разд. 5.2.

5.4. Высокий фон

Здесь может играть роль один или сразу несколько факторов:

- неспецифическое связывание зонда;
- неспецифическое связывание антител с авидином;
- неспецифическое связывание субстрата.

5.4.1. Неспецифическое связывание зонда

Меченые зонды (особенно рибонуклеиновые кислоты) могут неспецифически связываться с клетками разных типов, например, часто наблюдается связывание с эозинофилами. Зонды, меченные биотином, могут связываться с эндогенным авидином или (поскольку при нейтральных рН биотин заряжен положительно) с белками внеклеточного матрикса. Для других молекул-свидетелей, например дигоксигенина, такой проблемы не существует. Особенно сильное неспецифическое связывание (прежде всего с ядерными структурами) характерно для коротких (менее 200 п.н.) зондов. Эту причину повышения фона легко устранить, контролируя с помощью блот-гибридизации по Саузерну размер зонда (гл. 14).

5.4.2. Неспецифическое связывание антител с авидином

Такое связывание обычно происходит, если не были приняты специальные меры для его предотвращения. Так, полноразмерные антитела способны связываться с Fc-рецепторами клеточной поверхности, и это связывание можно уменьшить, если использовать их F(ab)₂-фрагменты. Для ослабления неспецифического связывания, обусловленного электростатическими взаимодействиями, можно провести предварительную инкубацию с бычьим сывороточным альбумином или, если этого окажется недостаточно, с антисыворотками человека или животных. Связывание авидина уменьшается при инкубации в обезжиренном молоке (см. гл. 9) или при использовании модифицированного авидина — стрептавидина, который при рН 7 не заряжен.

5.4.3. Неспецифическое связывание субстрата

Такое связывание наблюдается при:

- наличии эндогенной ферментативной активности;
- спонтанном изменении субстрата;
- связывании субстрата с внеклеточными компонентами среза.

Чаще всего в препаратах присутствует эндогенная пероксидаза, способы блокирования которой рассмотрены в разд. 3.6. Для блокирования эндогенной щелочной фосфатазы (эта проблема, правда, возникает реже) в раствор субстрата вводят левамизол, не

ингибирующий щелочную фосфатазу кишечника (см. протокол 4.7). Спонтанное изменение особенно часто наблюдается для субстратов пероксидазы, но его нельзя исключить и для некоторых субстратов щелочной фосфатазы, например быстрого красного TR. Вероятность нежелательного изменения субстрата можно уменьшить, готовя субстраты непосредственно перед их нанесением на срез. Связывание субстрата с внеклеточными компонентами наблюдается особенно часто при анализе мазков шейки матки; если не принять необходимых мер, то взаимодействие субстрата щелочной фосфатазы НСТ/БХИФ с муцинами приведет к сильному фоновому окрашиванию (гл. 9).

6. За лабораторным столом

6.1. Оборудование

Для проведения процедуры гибридизации *in situ* как таковой нужно сравнительно простое оборудование. Самое сложное в этой методике — получение, очистка и мечение зондов. Получение зондов детально описано в гл. 13. Кроме того, все больше разнообразных зондов появляется в продаже (например, их можно приобрести у фирм Cambridge Research Biochemicals, UK, и Clontech, UK), если не в меченом виде, то в виде достаточно чистой для проведения мечения ДНК. Для анализа замороженных срезов и срезов залитых в парафин тканей требуется следующее оборудование:

- емкости для хранения в жидком азоте или морозильник на -70°C ;
- морозильник на -20°C ;
- холодильник на $+4^{\circ}\text{C}$;
- термостаты суховоздушные на 95 и 42°C ;
- водяные бани;
- инкубационные камеры;
- автоматические микропипетки на 5 мкл — 1 мл;
- кюветы для окрашивания и держатели для предметных стекол;
- меченые зонды или плазмиды либо все необходимое для их мечения и очистки;
- реактивы для гибридизации и отмывания;
- первые и контрольные антитела;
- вторые и третьи антитела и реактивы;
- реактивы для приготовления буферов и субстратов;
- все необходимое для защиты от радиоактивного излучения (в случае работы с изотопами; см. гл. 5 и 7);
- красители и среды для монтирования срезов.

6.2. Реактивы

К реактивам предъявляются такие же требования, как и при проведении иммуноцитохимических исследований (см. разд. 7.2, гл. 2). Особая аккуратность необходима при работе с зондами: загрязнение препаратов РНКазами или ДНКазами может привести к их расщеплению. Следует отметить также, что растворы для гибридизации и отмывания содержат токсичный и обладающий мутагенным эффектом формамид.

6.3. Автоматизация

Методы неизотопной детекции достаточно легко автоматизировать с помощью применяемого в иммуноцитохимии оборудования (разд. 3.7, гл. 2). Труднее поддаются автоматизации процессы подготовки гибридизационных растворов, процедуры денатурации и гибридизации; ко времени написания этого обзора были сделаны только первые попытки такого рода. Автоматизированная система, основанная на использовании капиллярных сил [37], не нашла широкого применения в основном вследствие высокой вязкости гибридизационной смеси из-за присутствия в ней декстрансульфата. Впрочем, при работе с большим числом срезов автоматизация одной только детекции может сберечь много сил и времени.

7. Комбинирование методов

7.1. Гибридизация *in situ* и гистологическое окрашивание

Комбинируя гибридизацию *in situ* с обычным гистологическим окрашиванием, необходимо соблюдать два условия. Во-первых, вещества, с которыми связываются красители, не должны разрушаться под действием протеаз и при повышении температуры. Во-вторых, цвета, получаемые при окрашивании и при детекции гибридизационного сигнала, должны контрастировать. В связи с этим при проведении ГИС для окрашивания обычно используют гематоксилин, позволяющий выявить общую морфологию ткани, но можно применять и другие удовлетворяющие описанным выше требованиям красители.

7.2. Гибридизация *in situ* и иммуноцитохимия

В этом случае необходимо подобрать условия, удовлетворяющие следующим трем требованиям:

- при различных ферментативных обработках должны сохраняться как антигены, так и нуклеиновые кислоты;
- при иммунодетекции не должно происходить перекрестных реакций;
- субстраты должны окрашиваться в контрастные цвета, чтобы не возникало никакой неоднозначности при интерпретации результатов.

Первое требование является безусловным; иногда даже приходится отказываться от всякой ферментативной обработки и демаскирования, если они сопровождаются разрушением антигенов. В связи с этим сначала проводят полное (вплоть до образования окрашенного продукта) иммуноцитохимическое выявление антигена (гл. 2) и только после этого — демаскирование нуклеиновых кислот и гибридизацию *in situ*.

Из всего сказанного следует, что для иммуноцитохимического анализа необходимо использовать субстрат, устойчивый как к протеолизу, так и к тепловой денатурации. На наш взгляд, наиболее подходящим субстратом является НСТ/БХИФ. В этом случае обработка протеазами и денатурация приводят к разрушению использованных при иммуномечении реактивов и тем самым исключаются перекрестные реакции между системами детекции, используемыми при гибридизации *in situ* и иммуноцитохимии. С другой стороны, может оказаться, что одна и та же протеолитическая обработка необходима для демаскирования как антигена, так и нуклеиновой кислоты. И вновь здесь не возникает никаких проблем, поскольку иммуноцитохимическую детекцию можно провести до ГИС, и если образовавшийся окрашенный продукт устойчив к денатурации, то ГИС приведет к двойному окрашиванию срезов. И наконец, бывают ситуации, когда необходимая для выявления антигена обработка (например, трипсинизация) недостаточна для демаскирования нуклеиновых кислот. В таком случае оптимальный метод демаскирования подбирается опытным путем. Так, мы обнаружили, что эффективного демаскирования можно достичь повторной (после иммунохимического выявления антигена) протеолитической обработкой с использованием меньших концентраций протеиназы К или солянокислого пепсина. Такой подход с успехом применялся нами при анализе нескольких поверхностных и цитоплазматических антигенов с одновременным выявлением ДНК вируса папилломы человека (протокол 4.8).

Перекрестные реакции между используемыми для иммунологической детекции реактивами происходит относительно

редко, поскольку применяющиеся при первой детекции реактивы в ходе последующих ферментативных обработок и денатурации разрушаются. Тем не менее необходимо убедиться в отсутствии перекрестных реакций с помощью соответствующих контролей.

Контрастная окраска образующихся при работе с различными субстратами продуктов реакции необходима, когда используется несколько меток, особенно при одновременном определении белков и нуклеиновых кислот в одном клеточном компартменте, например цитоплазме или ядре. Мы обнаружили, что хороший контраст при обычной световой микроскопии наблюдается тогда, когда продукты реакции имеют красный и синий/черный цвета (протокол 4.8). Продукты красного цвета в реакции с пероксидазой образуются, если в качестве субстрата используется 3-амино-9-этил-карбазол/пероксид водорода, а в реакции с ЩФ, если используется быстрый красный или новый фуксин (гл. 2). Сине-черный цвет имеют продукты реакции, образующиеся при связывании пероксидазы с диаминобензилином/пероксидом водорода (гл. 2), усилении серебром окрашенных коллоидным золотом антител (гл. 3), связывании ЩФ с НСТ/БХИФ (см. протокол 4.7) или быстрым голубым ВВ (гл. 2). Значительно больше вариантов окрашивания можно получить, если использовать флуоресцентные метки (гл. 6). В протоколе 4.8 описан один из возможных вариантов комбинирования иммуноцитохимии и ГИС [38].

Протокол 4.8. Комбинирование иммуноцитохимии и неизотопной ГИС

Используя один и тот же срез, последовательно проводят иммуноцитохимию и неизотопную ГИС. Моноклональные первые антитела выявляют с помощью ЩФАЩФ, а ДНК-гибриды — с помощью пероксидазы. Впрочем, можно использовать и другие способы детекции (разд. 7.2).

А. Иммуноцитохимия

Материалы

См. протокол 4.7.

Методика

1. Депарафинируют срез, как описано в протоколе 4.4.

Протокол 4.8 (Продолжение)

2. При необходимости демаскируют антигены с помощью соответствующих ферментов (например, трипсина)¹⁾, а затем блокируют срез с помощью БСА или антисывороток (гл. 2).
3. Наносят на срез первые антитела, разведенные в ТСБ до нужного титра, и инкубируют его 30 мин при комнатной температуре или в течение ночи при 4 °С.
4. Промывают два раза по 5 мин в ТСБ.
5. Инкубируют в ТСБ в течение 20 мин с кроличьими антителами к белкам мыши при оптимальном разведении.
6. Промывают два раза по 5 мин в ТСБ.
7. Инкубируют 20 мин с разведенным в ТСБ ЩФАЩФ-комплексом.
8. Промывают два раза по 5 мин в ТСБ.
9. Для усиления сигнала можно повторить этапы 5–8, сократив время инкубации до 10 мин.
10. Выявляют сигнал с помощью НСТ/БХИФ, как описано в протоколе 4.7, и тщательно промывают срез в воде.

Б. Гибридизация *in situ*

1. Демаскируют нуклеиновые кислоты с помощью ограниченного протеолиза (протокол 4.4)²⁾.
2. Проводят гибридизацию с зондом, меченным дигоксигенином или биотином (протокол 4.5).
3. Отмывают срез после гибридизации, как описано в протоколе 4.6.
4. Детектируют гибриды с помощью авидина—пероксидазы и АЭК/Н₂О₂ (протокол 4.7) в случае биотинилированных зондов или с помощью трехступенчатой системы детекции с использованием АЭК/Н₂О₂ в качестве индикатора в случае зондов, меченных дигоксигенином³⁾.

¹⁾ При выявлении капсидных белков вируса папилломы обработка протеазами не требуется, а при анализе цитокератинов необходима трипсинизация.

²⁾ Если при проведении иммуноцитохимии обработка протеазами не требовалась, то протеолиз проводят в условиях, описанных в протоколе 4.4. Если же для выявления антигена демаскирование необходимо, то условия второй протеолитической обработки подбирают опытным путем. Обычно наилучшие результаты дает снижение концентрации ферментов по сравнению с приведенными в протоколе 4.4.

³⁾ В нашей лаборатории наилучшие результаты были получены, когда для выявления антигена использовались ЩФАЩФ и НСТ/БХИФ, а для выявления меченных дигоксигенином зондов — АЭК/Н₂О₂.

7.3. Многократная гибридизация in situ

Иногда проводят двойную и тройную гибридизацию in situ (соответствующие методы анализа парафиновых срезов и цитологических препаратов описаны в гл. 6 и 9). Такой прием применяется особенно часто в тех случаях, когда препараты представляют большую ценность или когда исследуются взаимоотношения между нуклеиновыми кислотами, например внутри одного ядра. Принципы, которые при этом используются, не отличаются от таковых при комбинировании иммуноцитохимии и гибридизации in situ.

8. Использование метода гибридизации in situ для диагностики заболеваний

Метод ГИС пригоден для выявления любой нуклеиновой кислоты при условии, что существует подходящий зонд [39]. Наибольший интерес представляет: а) выявление в клиническом материале вирусных нуклеиновых кислот (гл. 5 и 9); б) определение хромосомоспецифичных последовательностей в интерфазном ядре (гл. 6 и 9); в) локализация в клиническом материале специфических мРНК (гл. 7 и 8). Более подробно все эти вопросы мы рассмотрим в следующих главах.

Благодарности

С. Х. является стажером клинической лаборатории CRC и стипендиатом Green College, Oxford. Работа Дж. О'Д. М. финансировалась из средств гранта, предоставленного Cancer Research Campaign (UK).

Литература

1. Gall J. G., Pardue M. L. (1969). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **63**, 378.
2. John H. A., Birnstiel M. L., Jones K. W. (1969). Nature (Lond.), **223**, 582.
3. Gerhard D. S., Kawasaki E. S., Barncroft F. C., Szabo P. (1981). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **78**, 3755.
4. Bhatt B., Burns J., Flannery D., McGee J. O'D. (1988). Nucleic Acids Res., **16**, 3951.
5. Bresser J., Evinger-Hodges M. J. (1987). Gene Anal. Tech., **4**, 89.
6. Singer R. H., Lawrence J. B., Villnave C. (1986). Biotechniques, **4**, 230.
7. Burns J., Graham A. K., Frank C., Fleming K. A., Evans M. F., McGee J. O'D. (1987). J. Clin. Pathol., **40**, 858.
8. Burns J., Graham A. K., McGee J. O'D. (1988). J. Clin. Pathol., **41**, 897.

9. *Herrington C. S., Burns J., Graham A. K., McGee J. O'D.* (1990). *Histochem. J.*, **22**, 545.
10. *Matthews J. A., Kricka L. J.* (1988). *Analyt. Biochem.*, **169**, 1.
11. *Hopman A. H. N., Wiegant J., Tesser G. I., Van Duijn P.* (1986). *Nucleic Acids Res.*, **14**, 6471.
12. *Landegent J. E., Jansen in di Wal N., Baan R. A., Hoeijmakers J. H. J., Van der Ploeg M.* (1984). *Exp. Cell Res.*, **153**, 61.
13. *Lawrence J. B., Villnave C., Singer R. H.* (1988). *Cell*, **52**, 51.
14. *Herrington C. S., Graham A. K., McGee J. O'D.* (1991). *J. Clin. Pathol.*, **44**, 33.
15. *Langer P. R., Waldrop A. A., Ward D. C.* (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6633.
16. *Brigati D. J., Myerson D., Leary J. J., Spalholz B., Travis S. Z., Fong C. K. et al.* (1983). *Virology*, **126**, 32.
17. *Morimoto H., Monden T., Shimano T., Higashiyama M., Tomita N., Murotani M., Matsuura N., Okuda H., Mori T.* (1987). *Lab. Invest.*, **57**, 737.
18. *Hopman A. H. N., Wiegant J., Tesser G. I., Van Duijn P.* (1986). *Nucleic Acids Res.*, **14**, 6471.
19. *Landegent J. E., Jansen in di Wal N., Baan R. A., Hoeijmakers J. H. J., Van der Ploeg M.* (1984). *Exp. Cell Res.*, **153**, 61.
20. *Matthews J. A., Kricka L. J.* (1988). *Anal. Biochem.*, **169**, 1.
21. *Pringle J. H., Ruprai A. K., Primrose L., Keyte J., Potter L., Close P., Lauder I.* (1990). *J. Pathol.*, **162**, 197.
22. *Thein S. L., Wallace R. B.* (1986). In: *Human genetic diseases: a practical approach* (ed. K. E. Davies), pp. 33–50. IRL Press, Oxford.
23. *Ochman H., Medhora M. M., Garza D., Hartl D. L.* (1990). In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. White), pp. 219–27. Academic Press Inc., San Diego.
24. *Bramwell N. H., Burns B. F.* (1988). *Exp. Haematol.*, **16**, 730.
25. *Del Mistro A., Braunstein J. D., Halwer M., Koss L. G.* (1987). *Hum. Pathol.*, **18**, 936.
26. *Dirks R. W., Raap A. K., Van Minnen J., Vreugdenhil E., Smit A. B., Van Der Ploeg M.* (1989). *J. Histochem. Cytochem.*, **37**, 7.
27. *Anderson M. L. M., Young B. D.* (1985). In: *Nucleic acid hybridization: a practical approach* (ed. B. D. Hames, S. J. Higgins), pp. 73–111. IRL Press, Oxford.
28. *Young B. D., Anderson M. L. M.* (1985). In: *Nucleic acid hybridization: a practical approach* (ed. B. D. Hames, S. J. Higgins), pp. 47–71. IRL Press, Oxford.
29. *McConaughy B. L., Laird C. D., McCarthy B. J.* (1969). *Biochemistry*, **8**, 3289.
30. *Cox K. H., DeLeon D. V., Angerer R. C.* (1984). *Dev. Biol.*, **101**, 485.
31. *Herrington C. S., de Angelis M., Evans M. F., Troncone G., McGee J. O'D.* (1992). *J. Clin. Pathol.*, **45**, 385.
32. *Duhamel R. C., Johnson D. A.* (1985). *J. Histochem. Cytochem.*, **33**, 711.
33. *Singer R. H., Lawrence J. B., Rashchian.* (1987). In: *In situ hybridization. Applications to neurobiology* (ed. K. L. Valentino, J. H. Eberwine, J. D. Barchas), pp. 71–96. Oxford University Press, Oxford.
34. *Cordell J. L., Falini B., Erber W. N., Ghosh A. K., Abdulaziz Z., MacDonald S., Pulford K., Stein H., Mason D. Y.* (1984). *J. Histochem. Cytochem.*, **32**, 219.
35. *Herrington C. S., Flannery D. M. J., McGee J. O'D.* (1990). In: *In situ hybridization: Principles and practice* (ed. J. M. Polak, J. O'D. McGee), pp. 187–215. Oxford University Press, Oxford.

36. Hsu S. M., Raine L., Fanger H. (1981). *J. Histochem. Cytochem.*, **29**, 577.
37. Unger E. R., Brigati D. J., Chenggis M. L., Budgeon L. R., Koebler D., Cuomo C. Kennedy T. (1988). *J. Histotechnol.*, **11**, 253.
38. Graham A. K., Herrington C. S., McGee J. O'D. (1991). *J. Clin. Pathol.*, **44**, 96.
39. Herrington C.S, McGee J. O'D. (1990). In: *In situ hybridization: application to developmental biology and medicine* (ed. N. Harris, D. G. Wilkinson), pp. 241–65. Cambridge University Press, Cambridge.

ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСНЫХ ГЕНОВ МЕТОДОМ ГИБРИДИЗАЦИИ *IN SITU*

Стинга М. Сирьянен

1. Введение

В отличие от гибридизации на твердых подложках гибридизация *in situ* позволяет локализовать специфические нуклеотидные последовательности непосредственно в клетках или тканевых срезах. Этот метод разработали в 1969 г. Пардю и Голл [1] и независимо от них Джонс и др. [2]. С накоплением данных о молекулярной структуре вирусов и других микроорганизмов и с разработкой методов получения зондов с помощью ферментативного синтеза или рекомбинантных ДНК появилась возможность выявлять чужеродный генетический материал в клинических препаратах [3–5]. Большой прогресс в молекулярной клинической диагностике был достигнут после разработки методов нерадиоактивного мечения [6, 7]. Сейчас гибридизационные методы успешно дополняют рутинные методы диагностики, позволяя идентифицировать в культурах тканей и клеток самые разные микроорганизмы. Иммуноцитохимические методы выявления антигенов и детекция антител с помощью ферментного иммуносорбентного метода (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay, ELISA) или радиоиммунологического анализа (РИА) применяются в диагностике уже давно, а в последнее время все более широкое распространение находит высокоспецифичный и чувствительный метод гибридизации *in situ*.

2. Принципы метода

Принципы метода гибридизации *in situ* изложены в гл. 4 и аналогичны таковым для метода блот-гибридизации: зонд наносят прямо на образец, содержащий генетический материал, который иммобилизован в твердом субстрате (в данном случае в интактной клетке). Срез ткани, фиксированный на предметном стекле, обрабатывают протеазой и/или кислотой, чтобы зонд мог достичь ядерной ДНК, предварительно денатурированной нагреванием. Если в срезе присутствует ДНК, комплементарная зонду, происходит гибридизация. Не связанный меченый зонд или ошибочно спарившаяся ДНК удаляют интенсивным промыванием препарата, а свя-

завшийся зонд детектируют иммуногистохимическими методами или с помощью радиоавтографии. Таким способом удастся идентифицировать ДНК, локализованную в отдельных хромосомах, клетках и тканях [8, 9]. Нуклеиновой кислотой-мишенью может быть и мРНК, обычно представленная большим числом копий, чем ДНК [10, 11]. Оптимальные условия гибридизации с ДНК- и РНК-зондами для разных ситуаций описаны в работах [12–14].

2.1. Подготовка предметных стекол

Основная проблема, которая возникает при гибридизации *in situ*, — отлипание срезов от предметных стекол. Обычно стекла покрывают различными адгезивами, в частности поли-L-лизин (гл. 7), желатиной с алюмохромовыми квасцами (гл. 2), подкисленным раствором Денхардта. При этом для достижения эффективной адгезии мол. масса поли-L-лизина должна быть выше 150 000. К сожалению, ни один из этих адгезивов не подошел для наших опытов, особенно в случае фиксированных формалином, заключенных в парафин биоптатов и/или больших по площади тканевых срезов. Примерно 20 лет назад был разработан метод связывания биохимически активных лигандов с неорганическими субстратами. Этот метод с помощью реагентов на основе органосилана мы попытались использовать для прикрепления к стеклу тканевых срезов или клеток [6]. Модифицировав органосиловый метод, предложенный в работе [15], мы достигли 100%-ного прилипания ткани к стеклам без каких-либо артефактов. Наша методика описана в протоколе 5.1.

Протокол 5.1. Подготовка предметных стекол

1. Промывают стекла в 1М HCl в течение 20 мин, а затем в проточной воде в течение 30 мин.
2. Споласкивают стекла стерильной водой и высушивают.
3. Погружают стекла в 2% органосилан (гамма-аминопропилтриэтоксисилан) в ацетоне¹⁾.
4. Инкубируют 30 мин при комнатной температуре.
5. Промывают стекла в проточной воде в течение 30 мин, а затем в трех сменах стерильной воды.
6. Высушивают стекла в термостате при 100 °C в течение 1 ч.
7. Хранят стекла при комнатной температуре в защищенном от пыли месте.

¹⁾ Раствор органосилана хранят только в течение суток. За один прием можно обработать до 500 стекол.

2.2. Изготовление образцов

2.2.1. Мазки

Мазки готовят из клинического материала или из культуры клеток. Клетки наносят тонким слоем на маркированную часть предметного стекла, покрытого адгезивом, высушивают на воздухе и сразу же фиксируют в течение 10 мин в охлажденном ацетоне или в 95% этаноле. Клетки прекрасно сохраняют свою морфологию при фиксации периодат-лизин-параформальдегид-глутаральдегидом (ПЛПГ; протокол 5.2) или фиксатором Карнуа (60% хлороформ, 30% этанол, 10% уксусная кислота). Еще лучшие результаты можно получить, используя для приготовления препаратов так называемую клеточную центрифугу (протокол 5.3).

Протокол 5.2. Приготовление периодат-лизин-параформальдегид-глутаральдегидного фиксатора

1. Готовят маточный раствор лизинового буфера (0,1 М лизин, 50 мМ Na_2HPO_4 , pH 7,4):
 - растворяют 18,3 г лизинмоногидрохлорида и 13,4 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ в 1 л воды;
 - доводят pH до 7,4 с помощью HCl и хранят при 4 °C.
2. Готовят 4% (в/о) параформальдегид:
 - растворяют 20 г параформальдегида в 500 мл деионизованной воды;
 - нагревают раствор до 60 °C, пока осадок параформальдегида частично не растворится, и по каплям (1 капля/10 мин) добавляют 10 М NaOH до тех пор, пока раствор не станет прозрачным.
3. Готовят 8% глутаральдегид, разводя 10 мл 50% маточного раствора в 52,5 мл дистиллированной воды.
4. Готовят фиксатор ПЛПГ, смешивая следующие компоненты:
 - 60 мл лизинового буфера (п. 1);
 - 10 мл 4% параформальдегида (п. 2);
 - 62,5 мл 8% глутаральдегида (п. 3);
 - добавляют 160 мг метапериодата натрия и перемешивают 10 мин.

2.2.2. Препараты, приготовленные с помощью центрифугирования

Для препаратов, приготовленных из суспензии клеток в буфере с помощью центрифугирования, характерно равномерное распределение клеток и прекрасная морфология. Можно использовать также культуру клеток, суспендированную в буфере без антибиотиков.

Протокол 5.3. Препараты для гибридизации *in situ*, приготовленные с помощью центрифугирования

1. Собирают клеточный материал двух последовательных соскобов, полученных с помощью шпателя или щеточки, в пробирку с 20–50 мл ФСБ, содержащего гентамицин (50 мМ фосфатный буфер, pH 7,5, 150 мМ NaCl, 100 мкг/мл гентамицина).
 2. Хранят образцы при +4 °C не более суток.
 3. Встряхивают пробирку несколько раз, чтобы снять клетки со шпателя или щеточки, и вынимают последние из пробирки.
 4. Центрифугируют суспензию при 1500 g 10 мин.
 5. Аккуратно отсасывают супернатант пастеровской пипеткой.
 6. Ресуспендируют клетки в 10 мл ФСБ, вновь центрифугируют и сливают супернатант.
 7. Еще раз суспендируют клетки в 1 мл этого же буфера и переносят суспензию в пробирку фирмы Эппендорф для микроцентрифугирования.
 8. Центрифугируют 2 мин и удаляют супернатант.
 9. Оценивают количество клеток и ресуспендируют их в соответствующем объеме буфера ТЭ (10 мМ трис-HCl, 1 мМ ЭДТА, pH 7,5), содержащем 100 мМ NaCl. Для получения монослоя нужно примерно 20 000–30 000 клеток на одно предметное стекло.
 10. Предварительно смоченные фильтры накладывают на стекла, помещенные в центрифугу со 100 мкл ТЭ.
 11. Добавляют к 100 мкл ТЭ 10 мкл клеточной суспензии и центрифугируют при 300 g 5 мин для осаждения клеток на стеклах.
 12. Высушивают стекла при комнатной температуре.
 13. 10 мин фиксируют клетки в ПЛПГ (протокол 5.2) или в фиксаторе Карнуа.
 14. Быстро споласкивают препараты водой и высушивают на воздухе.
 15. Хранят препараты до гибридизации *in situ* при –20 °C.
-

2.2.3. Биоптаты

При оптимизации процессов приготовления препаратов и фиксации сохраняется максимальное количество клеточной РНК- или ДНК-мишени без существенного изменения морфологии. Полное сохранение морфологии обеспечивают соответствующие фиксаторы [16–18], однако при этом уменьшается проницаемость препарата для зонда. В отличие от ДНК, мРНК в клетке постоянно синтезируются и разрушаются ферментами, так что время жизни конкретной мРНК может быть относительно мало. Соответственно для точной локализации мРНК биоптат следует немедленно фиксировать или заморозить, а при интерпретации результатов гибридизации *in situ* — принимать во внимание, сколько времени прошло с момента получения биоптата до его фиксации.

а. Криостатные срезы

Для локализации мРНК мы предпочитаем фиксировать ткани забуференным 4% параформальдегидом; для небольших биоптатов достаточно 2–4-часовой фиксации. Перед замораживанием ткань погружают в сахарозу, чтобы уменьшить артефакты, и хранят до приготовления срезов в жидком азоте. Ткань можно заморозить сразу же после биопсии и затем тоже хранить в жидком азоте. В криостате при -20°C получают толстые срезы (4–5 мкм) и помещают их на подготовленные нужным образом предметные стекла. Эти срезы фиксируют 10 мин 4% параформальдегидом, высушивают на воздухе и хранят до гибридизации при -80°C [1, 10].

Для выявления ДНК получают криостатные срезы толщиной 5–10 мкм при температуре -20°C и помещают их на предметные стекла (протокол 5.1). Стекла высушивают на воздухе и погружают в подходящий фиксатор, например в 4% параформальдегид (0°C , 10 мин) или ПЛПГ (0°C , 10 мин; протокол 5.2).

б. Препараты, фиксированные формалином и заключенные в парафин

Препараты, полученные при хирургических операциях, обычно фиксируют формалином. В нашей лаборатории фиксированный формалином и заключенный в парафин материал в основном используется для обнаружения вирусной ДНК [2, 19, 20]. Оптимальное время фиксации зависит от размеров биоптата, но не должно превышать 24 ч. При длительном, в течение нескольких дней или недель, хранении материала в формалине между нуклеотидами и аминокислотами ядерных белков образуются ковалентные связи, что препятствует денатурации ДНК. Хорошие результаты

получаются при фиксации 4% водным раствором формалина при комнатной температуре в течение 4 ч, а также фиксатором Боуэна (пикриновая кислота, формальдегид, уксусная кислота в соотношении 15:5:1) или ПЛПГ за 3–6 ч до заключения материала в парафин [16, 17]. Однако, по некоторым данным, фиксатор Боуэна значительно ослабляет гибридизационный сигнал, явно проигрывая в этом отношении нейтральному 10% формалину. Небольшие биоптаты можно фиксировать 70% этанолом в течение 24 ч перед заключением в парафин. Это позволяет анализировать их с помощью иммуноцитохимических методов.

2.3. Обработка срезов до гибридизации

2.3.1. Депарафинирование

Способ удаления парафина описан в гл. 4. Во избежание артефактов и появления фона, особенно при работе с радиоактивно мечеными зондами, важно депарафинировать срез полностью.

2.3.2. Кислотный гидролиз

По данным некоторых авторов, обработка срезов 0,2 М соляной кислотой в течение 20 мин усиливает гибридизационный сигнал [3, 16]. При такой обработке из тканей удаляются белки, что увеличивает их проницаемость для зондов. Впрочем, по нашим данным, при выявлении генетического материала вирусов кислотный гидролиз, напротив, приводит к ослаблению гибридизационного сигнала. Возможно, это связано с тем, что при кислотной обработке происходит апуринизация ДНК и это ухудшает гибридизацию [19].

2.3.3. Протеолиз

Обработка срезов протеолитическими ферментами — очень ответственный этап (см. также гл. 4). Если протеолиз недостаточно продолжителен, то зонд не может проникнуть внутрь клетки и достичь мишени, а если слишком длительный, то происходят серьезные нарушения структуры клеток и интерпретация результатов становится невозможной или из ткани вымываются нуклеиновые кислоты-мишени, а сами клетки теряют адгезивные свойства и отлипают от стекла [11, 13, 17, 19]. Важное значение имеет качество протеолитического фермента: если в ферментном препарате присутствуют нуклеазы, то может произойти разрушение ДНК-мишени. Чтобы предотвратить это, в инкубационную смесь добавляют 5 мМ ЭДТА, ингибирующий магнийзависимые нукле-

азы. Мы предпочитаем использовать протеиназу К (Boehringer Mannheim). Оптимальное время протеолиза зависит от типа зонда, ткани и режима фиксации. Например, для излишне фиксированных тканей (обработанных концентрированным раствором формалина или фиксированных слишком долго) необходим более длительный протеолиз. Режим протеолиза в каждой лаборатории следует подбирать опытным путем.

Некоторые авторы указывают на целесообразность дополнительной фиксации параформальдегидом для усиления гибридизационного сигнала [3], полагая, что при протеолизе ДНК-мишень может выходить из внутриклеточного матрикса и экстрагироваться в ходе гибридизации или удаляться со стекла во время многочисленных последующих промываний препаратов, а обработка параформальдегидом способствует мягкой фиксации этих последовательностей в ткани. Однако, проводя гибридизацию *in situ* для выявления вирусных генов, мы не заметили никакого положительного эффекта от дополнительной фиксации, что противоречит данным других авторов (см. гл. 9).

2.3.4. Ацетилирование

Иногда для уменьшения фонового окрашивания проводят ацетилирование — наиболее эффективный способ снижения неспецифического связывания отрицательно заряженных зондов [17, 20, 21]. Ацетилирование необходимо прежде всего при работе с радиоактивными зондами. Используя ^{35}S -зонд, полученный с помощью ник-трансляции, и проводя радиоавтографию в течение 4–6 сут, мы обходились без ацетилирования. Однако при более длительной экспозиции или слишком сильном неспецифическом связывании (высоком фоне) эта процедура необходима.

2.4. Зонды

2.4.1. Типы зондов

Имеются три основные типа зондов [11, 21, 22]:

- а) фрагменты комплементарной ДНК (кДНК), входящие в состав плазмидного вектора или изолированные;
- б) комплементарная РНК (кРНК), встроенная в плазмидный вектор, который содержит сайт инициации транскрипции, распознаваемый бактериальной РНК-полимеразой (обычно SP6);
- в) синтетические не кодирующие олигонуклеотиды, полученные с помощью автоматического ДНК-синтезатора.

Все они описаны в гл. 4. Для гибридизации in situ широко используются двухцепочечные зонды и высокоспецифичные термостабильные РНК-зонды. Синтетические олигонуклеотиды обладают рядом преимуществ перед кДНК: а) для них характерна постоянная и высокоспецифическая активность; б) их можно синтезировать исходя из данных о соответствующей аминокислотной последовательности, не зная последовательности ДНК; в) есть возможность получать нуклеотидные последовательности, комплементарные данному гену. Однако у них есть и недостатки: стабильность этих зондов мало изучена; не разработаны оптимальные условия гибридизации; если по каким-либо причинам в данные о нуклеотидной последовательности вкралась ошибка (например, типографского характера), могут быть получены неправильные результаты [11, 12].

2.4.2. Мечение зондов

Зонды можно пометить как радиоактивными изотопами, так и неизотопными метками (табл. 5.1). В качестве радиоактивных меток обычно используют ^{32}P , ^{35}S или ^3H . Наиболее популярная из них — ^{35}S , с ее помощью можно получать хорошее разрешение при небольшой экспозиции. Еще лучшее разрешение дает ^3H , но время экспозиции оказывается слишком большим. Чтобы решить проблемы, связанные со стоимостью реагентов, безопасностью работы и стабильностью получаемых при радиоавтографии результатов, были созданы методы неизотопного мечения. Сейчас в качестве меток при гибридизации in situ используют биотин [3, 23], дигоксигенин, динитрофенол, ртуть, ацетиламинофлуорен и сульфонированные нуклеотиды. Долгое время считалось, что нерадиоактивные зонды не обеспечивают столь высокой чувствительности, как радиоактивные, но с разработкой более совершенных систем де-

Таблица 5.1. Свойства меченых зондов

	^3H	^{32}P	^{35}S	Биотин
Время экспозиции, сут	14–30	1–3	5–14	0,5–1
Стабильность, нед	> 30	1	4	100
Разрешение	Очень высокое	Среднее	Хорошее	Очень высокое
Чувствительность	Высокая	Высокая	Высокая	Средняя
Фон	Низкий	Средний	Низкий	Низкий
Безопасность	Высокая	Средняя	Хорошая	Полная
Удельная активность	Низкая	Высокая	Высокая	—

текции ситуация изменилась. Есть данные, что метод гибридизации *in situ* с использованием нерадиоактивных зондов не менее чувствителен, чем с использованием радиоактивных [6, 12, 24, 25].

2.4.3. Методы мечения

а. ДНК-зонды

Меченые ДНК-зонды можно получить несколькими способами (гл. 13). Наиболее популярный из них — метод ник-трансляции. Для этого можно использовать как специфическую ДНК в чистом виде, так и эту же ДНК в составе плазмидного вектора. Процедура получения ^{35}S -зондов с помощью ник-трансляции описана в протоколе 5.4, а зондов, меченных биотином и дигоксигенином, — в гл. 4. Биотинилируется около 30% ДНК, при этом bio-11-dUTP предпочтительнее bio-16-dUTP или bio-7-dATP. Наборы для ник-трансляции и детекции производят многие фирмы. Хорошие результаты дает дот-блот-гибридизация с ДНК в количестве порядка 10 пг (гл. 14). Обычно мы берем пятикратные количества ДНК (5 мкг) и реакционной смеси (250 мкл) по сравнению с приведенными в протоколе 5.4. Как показывает наш опыт, биотинилированные зонды можно хранить по меньшей мере 2 года. Ник-трансляцию можно проводить и при десятикратных пропорциях, однако степень биотинилирования при этом оказывается ниже.

Протокол 5.4. Получение ^{35}S -зондов с помощью ник-трансляции

А. Мечение

Материалы

- Раствор нуклеотидов: по 0,3 мМ dATP, dTTP, dGTP в 500 мМ трис-НСl, рН 7,8; 50 мМ MgCl_2 ; 100 мМ 2-меркаптоэтанол; 100 мкг/мл не содержащего нуклеаз БСА
- ^{35}S -dCTP (20 мКи/мкл)
- Стерильная дистиллированная вода
- Смесь ДНКазы I/ДНК-полимераза I: 0,5 ЕД/мкл ДНК-полимеразы I, 10 пг/мкл ДНКазы I в смеси, содержащей 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 мМ ацетат магния, 1 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1 мМ фенилметилсульфонилфторид, 50% глицерин, 100 мкг/мл очищенного от нуклеаз БСА

Методика

1. В коническую полипропиленовую пробирку емкостью до 1,5 мл, помещенную в ледяную баню, добавляют по очереди следующие реагенты.

• Раствор ДНК	1 мкг
• Раствор нуклеотидов	10 мкл
• ^{35}S -дСТР	16,6 мкл
• Смесь ДНКазы I/ДНК-полимераза I	8 мкл
• Стерильная дистиллированная вода	до 50 мкл

- Плотно закрывают пробирку и осторожно перемешивают содержимое, перевернув ее несколько раз. Центрифугируют на микроцентрифуге в течение нескольких секунд, чтобы содержимое осело на дно пробирки. Стараются избежать сильного встряхивания, чтобы не уменьшить активность ферментов.
- Инкубируют при 15 °C в течение 2 ч.
- Помещают пробирку на лед.

Б. Очистка

Материалы

- Пробирки (Sorvale Instruments No. 032400)
- Пробки для них (Sorvale Instruments No. 032400)
- Колонки (Bio-Rad No. 731-1550)
- Сефадекс G-50: мелкодисперсный, в 1 × SSC, 0,1% ДСН
- 20 × SSC: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0
- Буфер для колонки: 300 мМ NaCl, 10 мМ ЭДТА, pH 7,5, 0,1% ДСН, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5, 5,5 мМ дитиотрейтол (ДТТ)
- Бромфеноловый синий
- Дрожжевая тРНК (10 мг/мл)
- Буфер ТЭ: 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА

Методика

- Наполняют 3-сантиметровую колонку сефадексом G-50 следующим образом:
 - пипеткой вносят в колонку 5 мл сефадекса G-50;
 - пропускают 1 мл буфера для колонки.
- Добавляют к образцу 1 мл буфера для колонки и 50 мкл бромфенолового синего.
- Пропускают образец в 1 мл буфера через колонку, собирая всю жидкость, проходящую через колонку, до тех пор, пока не будет достигнута отметка 1,2 мл.
- К элюату добавляют 2 капли дрожжевой тРНК. Общий объем элюата должен составить 2–3 мл.
- Для осаждения ДНК добавляют 7–8 мл (2,5 объема) абсолютного этанола.
- Выдерживают смесь при –70 °C от 20 мин до 2 ч или оставляют на ночь при –20 °C.

Протокол 5.4 (Продолжение)

7. Центрифугируют при 14 000 g 20 мин при 4 °С.
 8. Сливают этанол и подсушивают осадок.
 9. Снова растворяют осадок в 200–250 мкл ТЭ.
 10. Переносят образцы в микроцентрифужные пробирки.
 11. Растворяют 1 мкл меченого зонда в 4 мл сцинтиллятора и измеряют радиоактивность на жидкостном сцинтилляционном счетчике.
-

б. РНК-зонды

Один из эффективных способов получения одноцепочечных РНК-зондов, специфичных к определенным последовательностям ДНК, основан на клонировании последовательности, примыкающей к промотору фага SP6 [10, 26]. Векторы для клонирования и РНК-полимераза SP6 имеются в продаже. Процедура мечения зондов биотином с помощью РНК-полимеразы SP6 описана в протоколе 5.5, а мечение РНК радиоактивными изотопами — в гл. 7.

Большинство зондов можно получить, используя нерадиоактивные гаптены, присоединенные к нуклеотидам. Чаще всего при синтезе РНК заменяют уридин его аналогами, а затем к каждому аналогу присоединяют биотин. В другом варианте в РНК включают УТР, уже меченный биотином или дигоксигенином (гл. 13).

Протокол 5.5. Мечение кРНК-зондов биотином

Материалы

- 5 × буфер для транскрипции: 200 мМ трис-НСl, рН 7,5; 30 мМ MgCl₂; 10 мМ спермидин; 0,05% БСА
- Смесь немеченых NTP: по 2,5 мМ АТР, СТР и GTP в 20 мМ трис-НСl, рН 7,5
- Свежеприготовленный 0,2 М ДТТ
- РНК-полимераза фага SP6
- 10 мМ аллиламин-УТР
- Ингибитор рибонуклеазы из плаценты человека
- N-гидроксисукцинимидбиотин (NHS-d-biotin фирмы Sigma, UK)
- 0,1 М борат натрия, рН 8,4
- 5 М ацетат аммония
- 3 М ацетат натрия, рН 5,2
- Буфер ТЭД: 10 мМ трис-НСl, рН 8,0; 10 мМ ЭДТА; 10 мМ ДТТ

Методика

1. Реакцию проводят при комнатной температуре, поскольку на льду в присутствии спермидина ДНК может выпасть в осадок. Смешивают по очереди следующие реагенты:

• 5 × буфер для транскрипции	4 мкл
• 0,2 М ДТТ	1 мкл
• Смесь немеченых трифосфатов	1,5 мкл
• Аллиламин-УТР	1 мкл
• Ингибитор рибонуклеазы из плаценты человека	20 ЕД (1 мкл)
• Линеаризованная ДНК-матрица	2 мкг
• Вода, обработанная ДЭПК	до 19 мкл
2. Добавляют 10 ЕД РНК-полимеразы фага SP6 (обычно 1 мкл).
3. Инкубируют 1 ч при 37 °С.
4. Добавляют 4 мкл 5 М ацетата аммония и 40 мкл этанола и выдерживают смесь для осаждения РНК 30 мин при -80 °С или в течение ночи при -20 °С.
5. Центрифугируют при 15 000 g 20 мин и удаляют водный слой.
6. Снова растворяют продукт в 50 мкл 0,1 М бората натрия, рН 8,4.
7. Растворяют 2 мг N-гидроксисукцинимидбиотина в 200 мкл N,N-диметилформамида и добавляют по 10 мкл смеси в каждую пробирку.
8. Инкубируют при комнатной температуре 2 ч.
9. Осаждают РНК, добавив 25 мкл 3 М ацетата натрия, рН 5,2, и 250 мкл охлажденного абсолютного этанола и выдерживают раствор в течение ночи при -20 °С.
10. Центрифугируют при 15 000 g 20 мин. Осторожно удаляют супернатант и растворяют осадок в 50 мкл буфера ТЭД; хранят при -20 °С.

в. Олигонуклеотидные зонды

Олигонуклеотиды можно пометить либо методом 3', 5'-концевого мечения, либо с помощью какой-либо аминосвязывающей группы [11, 25] (гл. 13). Биотин, флуорохромы или щелочную фосфатазу можно пришить к какому-либо модифицированному основанию, несущему соответствующее линкерное плечо, и включить это основание непосредственно в олигонуклеотиды, синтезируемые в автоматическом ДНК-синтезаторе. Метку можно пришить и к первичной аминогруппе линкерного плеча с помощью аминокреактивного бифункционального кросс-линкера [27, 28]. Используя олигонуклеотиды, меченные биотином или

флуорохромами описанным способом, мы получили более слабые гибридизационные сигналы, чем в том случае, когда мечение проводилось обычным методом. Впрочем, предварительные результаты с использованием в качестве метки кислой фосфатазы были весьма многообещающими.

2. ПЦР-зонды

Меченые зонды получают и с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (гл. 13), используя как радиоактивные, так и нерadioактивные метки [29]. ПЦР-зонды имеют заданную длину, определенную нуклеотидную последовательность, они высокоспецифичны и могут быть как одно-, так и двухцепочечными. В результате ПЦР происходит амплификация сегмента ДНК, расположенного между участками с известной последовательностью нуклеотидов. При этом праймерами в цепи реакций, катализируемых полимеразой *Taq*, служат олигонуклеотиды. Реакционный цикл включает денатурацию, отжиг праймеров и синтез ДНК. Процедура получения биотинилированных зондов с помощью ПЦР, предназначенных для выявления вируса папилломы человека, описана в протоколе 5.6 [30]. При биотинилировании важно поддерживать определенное соотношение между биотинилированным dUTP и dTTP. Максимальный выход достигается при концентрациях dTTP и биотинилированного dUTP 150 мкМ и 50 мкМ соответственно. Объем реакционной смеси можно увеличить до 250 мкл, при этом выход биотинилированного ПЦР-зонда остается прежним.

Протокол 5.6. Получение ДНК-зондов для выявления вируса папилломы человека

Материалы

- 5 × ПЦР-буфер: 10 мМ трис-НСl, рН 8,3 (при 25 °С), 500 мМ КСl, 15 мМ MgCl₂
- Bio-11-dUTP (Sigma, UK), растворенный в 100 мМ трис-НСl, 0,1 мМ ЭДТА, рН 7,5
- По 10 мМ dATP, dCTP, dGTP и dTTP
- По 50 мкл праймеров 1 и 2¹⁾
- Полимераза *Taq* (Perkin—Elmer Cetus, USA; 5 ЕД/мкл)
- Гликоген: 10 мг/мл
- Агароза: 10 мг/мл
- 2,5 М ацетат натрия, рН 5,2
- Буфер ТЭ: 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА

Методика

1. В микроцентрифужную пробирку, помещенную на лед, вносят по очереди следующие компоненты.

• ДНК-мишень	0,2 фмоль (1–10 нг плазмиды длиной 8 т.п.н.)
• 10 × ПЦР-буфер	2,5 мкл
• 10 мМ dATP	1 мкл
• 10 мМ dCTP	1 мкл
• 10 мМ dGTP	1 мкл
• 5 мМ dTTP	1,5 мкл
• 0,3 мМ bio-11-dUTP	8,3 мкл
• Праймер 1 (50 мкМ)	1 мкл
• Праймер 2 (50 мкМ)	1 мкл
• Полимераза <i>Taq</i>	1 мкл
• Дистиллированная вода	до 50 мкл

2. Добавляют в пробирку 50 мкл вазелинового масла.

3. Проводят 40 циклов ПЦР в термоциклере в следующих условиях (гл. 13):

- предварительная денатурация при 95 °С в течение 5 мин;
- денатурация при 95 °С в течение 30 с;
- отжиг при 55 °С в течение 30 с;
- амплификация при 72 °С в течение 60 с.

4. В конце 40-го цикла время амплификации увеличивают на 5 мин.

5. Добавляют 1 мкл гликогена, 5 мкл 2,5 М ацетата натрия, рН 5,2, и 110 мкл этанола. Инкубируют в течение ночи при –20 °С.

6. Центрифугируют на микроцентрифуге при максимальной скорости в течение 15 мин.

7. Высушивают содержимое пробирки под вакуумом.

8. Растворяют осадок в 50 мкл ТЭ.

9. Степень биотинилирования зонда определяют с помощью электрофореза: биотинилированный ПЦР-продукт движется медленнее небитинилированного. ПЦР-продукт переносят на фильтр по Саузерну и выявляют с помощью комплекса стрептавидин/кислая фосфатаза, как это описано в протоколе 5.7 (см. также гл. 14).

¹⁾ Нуклеотидные последовательности праймеров даны в работе [30].

2.4.4. Концентрация зонда

Максимальная концентрация зонда определяется тем его количеством, которое имеется в распоряжении исследователя, и соотношением сигнал/фон. Во всяком случае она должна быть выше, чем при гибридизации на фильтрах: если для гибридизации *in situ* применяется радиоактивный зонд, полученный методом ник-трансляции, то его конечная концентрация в буфере для гибридизации должна составлять 0,5–1 мкг/мл [12–13], а если зонд биотинилирован, то она должна быть выше: 1–5 мкг/мл.

2.5. Денатурация

Денатурация — один из ключевых этапов гибридизации *in situ*, особенно при работе с парафиновыми срезами [8, 19]. Ее необходимо проводить при строго определенной температуре. Для контроля температуры на стеклах мы пользуемся термометром со шкалой 82–93 °С; температура в денатурационной камере поддерживается в диапазоне 100–110 °С [19]. Время инкубации для замороженных срезов составляет 3–5 мин, для парафиновых — 6–10 мин. Не следует нагревать препараты выше 100 °С — это ухудшает их качество. Время денатурации не должно превышать 10 мин, чтобы не допустить подсыхания срезов, которое неизбежно приведет к увеличению фона. В опытах по гибридизации с внутриклеточной ДНК срезы выдерживают 10 мин при температуре не ниже 90 °С, чтобы вся ДНК заведомо денатурировала [10, 13].

2.6. Условия гибридизации

Никаких универсальных условий для гибридизации *in situ* не существует, есть только некие общие правила, описанные в соответствующих протоколах. Более подробно этот вопрос рассматривается в гл. 4. Мы советуем проводить гибридизацию в достаточно жестких условиях, т. е. в диапазоне температур от $T_m - 10$ до $T_m - 17$ °С.

2.7. Промывание препаратов после гибридизации

В ходе гибридизации зонд образует дуплексы как с полностью гомологичными последовательностями, так и с последовательностями, степень гомологии которых с ним не очень высока. Чтобы удалить зонд из несовершенных дуплексов, препараты после

гибридизации отмывают в достаточно жестких условиях. Жесткость можно менять, варьируя концентрацию солевого буфера и формамида, а также температуру ([31]; см. также гл. 4). Если используются радиоактивно меченные зонды, то промывание ведут весьма интенсивно, в случае же биотинилированных зондов достаточно кратковременного промывания [12, 14]. После гибридизации с антисмысловыми РНК-зондами целесообразно обработать срезы РНКазой, которая гидролизует негибридизовавшийся одноцепочечный зонд [10].

2.8. Системы детекции

2.8.1. Радиоактивные зонды

В этом случае для детекции применяют радиоавтографию. Время экспозиции препаратов зависит от следующих факторов:

- используемого изотопа;
- удельной активности зонда;
- копийности ДНК- или РНК-мишеней;
- эффективности гибридизации;
- чувствительности системы детекции.

Обычно для обнаружения гетеродуплексов используют два радиоавтографических метода. В первом случае к стеклам с препаратами плотно прижимают рентгеновскую пленку, экспонируют ее нужное время и проявляют. Во втором стекла покрывают слоем фотоэмульсии, выдерживают их в темноте и затем проявляют [20, 21]. Последний метод используется в основном для обнаружения в клинических препаратах микроорганизмов (вирусов и бактерий), а первый — для локализации мРНК. Радиоавтографию, проявление и фиксацию следует проводить в соответствии с рекомендациями фирм-производителей; соответствующие примеры описаны в протоколе 5.8 и гл. 7.

2.8.2. Нерадиоактивные зонды

Для выявления различных генов и вирусных нуклеиновых кислот сейчас все более широко используются биотинилированные зонды. Системы детекции таких зондов хорошо отработаны, поскольку они давно используются в иммуноцитохимии. Многие зонды имеются в продаже и производятся несколькими фирмами. Для детекции биотинилированных зондов используют конъюгированный авидин или стрептавидин, причем последний

предпочтительнее, поскольку дает более низкий фон. Можно прибегнуть и к иммуноцитохимической детекции с помощью антител к биотину. Для повышения чувствительности и уменьшения неспецифического спаривания разработаны многоступенчатые системы детекции, в которых метка связывается с зондом не напрямую. Наилучшие результаты получались у нас, когда мы использовали комплекс стрептавидин—щелочная фосфатаза [12]. Чувствительность таких комплексов, имеющих в продаже, сильно варьирует. Частично это связано с тем, что разные препараты имеют неодинаковую удельную активность. Большинство комплексов хорошо работает при концентрации 4–10 ЕД/мл, однако для каждого препарата подходящую концентрацию следует подбирать опытным путем. Используя оптимальный ферментный комплекс, можно значительно повысить чувствительность метода гибридизации *in situ*. Заметим, что применение комплексов с ЩФ дает лучшие результаты, чем стандартная детекция с использованием пероксидазы хрена [9, 14, 17, 25, 32]. Проводя гибридизацию *in situ* с двойной меткой, можно одновременно выявлять два разных вирусных генома ([32–36]; см. также гл. 9).

2.9. Окрашивание

При гибридизации *in situ* можно использовать некоторые гистологические красители. Мы обычно работаем с красителями, окрашивающими цитоплазму, а для выявления гетеродуплексов, меченных радиоактивными изотопами, используем модифицированный гематоксилин Джилла (протокол 5.8) или модифицированный фуксин. В случае биотинилированных зондов прекрасный контраст со специфическими гибридизационными сигналами дает модифицированный фуксин или метиленовый зеленый.

3. Контроль специфичности

Чтобы убедиться в специфичности гибридизации *in situ*, необходимо поставить контрольные опыты, зависящие от используемого зонда и типа мишени (табл. 5.2). При гибридизации с выделенной РНК или рестрицированной ДНК, полученной после гелелектрофореза и переноса на твердую подложку (Саузерн- или Нозерн-блоттинг; гл. 14), должна обнаруживаться гибридизация с молекулами известного, точно заданного размера. Эти методы, сходные с Вестерн-блоттингом, который используют для контроля

Таблица 5.2. Контроль специфичности гибридизации *in situ*

-
- Саузерн- или Нозерн-блоттинг
 - Сочетание гибридизации *in situ* с иммуноцитохимией
 - Гибридизация с разными фрагментами специфичной последовательности
 - Предгибридизация зонда с кДНК или кРНК
 - Гибридизация с неспецифичными векторными последовательностями
 - Предварительная обработка срезов РНКазой
 - Одновременная обработка двух срезов на одном и том же предметном стекле
-

специфичности антител, позволяют убедиться в специфичности зонда. Гибридизация с положительными контрольными срезами должна давать ожидаемое распределение метки. При постановке отрицательного контрольного опыта из процедуры гибридизации исключают зонд и используют ткани, заведомо не содержащие искоемых нуклеиновых кислот. Специфичность гибридизационного сигнала проверяют, анализируя два серийных среза на одном и том же предметном стекле. При наличии подходящих антител одновременное проведение ГИС и иммуноцитохимического анализа на одном или нескольких серийных срезах позволяет убедиться в том, что мРНК и ее продукт локализованы в одних и тех же клетках (гл. 7). Если иммуноцитохимический анализ невозможен, то приходится проводить гибридизацию с зондами, содержащими разные специфические фрагменты. Отрицательный контрольный опыт может быть поставлен с неспецифическими векторными последовательностями или смысловым РНК-зондом. Используют также срезы, обработанные РНКазой, чтобы показать, что гибридизация имеет место лишь при наличии в ткани РНК. Чтобы оценить степень неспецифического окрашивания, все контрольные срезы следует окрашивать одновременно.

4. Стандартные протоколы

4.1. Гибридизация ДНК, содержащейся в цитологических препаратах, с ^{35}S -ДНК-зондами

Процедуру, описанную в протоколе 5.7, мы используем как для культур клеток, так и для соскобов. Метод дает очень низкий фон (рис. 5.1). Для улучшения морфологии клеток можно провести многократное обезвоживание, если же морфология незначительна, соответствующие процедуры исключают и перед гибридизацией просто проводят мягкую обработку клеток протеиназой К в концентрации 0,1 мкг/мл в ФСБ.

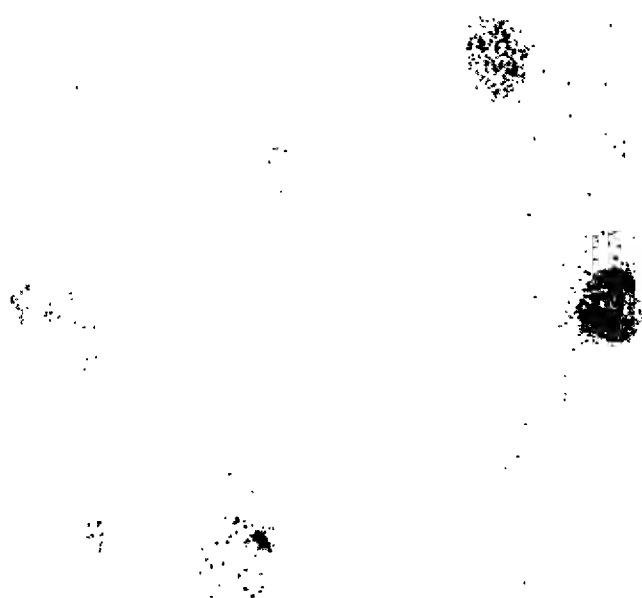


Рис. 5.1. Гибридизация *in situ* ³⁵S-ДНК бычьего папилломавируса с мышинными клетками С 127, трансформированными этим вирусом. В крупных трансформированных клетках отчетливо видны скопления зерен, в нетрансформированных клетках зерен нет.

Протокол 5.7. Гибридизация *in situ* ДНК цитологических препаратов с ³⁵S-зондами

Материалы

- 20 × SSC: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0
- 0,1 М триэтаноламин-HCl, pH 8,0
- Уксусный ангидрид

Методика

1. Вынимают препараты из холодильника и прогревают их до комнатной температуры. Используют штативы на 20—48 стекол.
2. Инкубируют препараты в 2 × SSC при 70 °C в течение 30 мин.
3. Проводят дегидратацию в двух сменах 70% этанола при комнатной температуре по 10 мин.
4. Переносят стекла в 95% этанол на 5 мин, затем высушивают их на воздухе.

5. Помещают стекла в 0,1 М триэтаноламин, хорошо перемешивают и добавляют уксусный ангидрид (3 мкл на 300 мл триэтанолamina). Инкубируют 10 мин при комнатной температуре.
6. Промывают стекла в $2 \times \text{SSC}$ в течение 5 мин при комнатной температуре.
7. Проводят дегидратацию в двух сменах 70% этанола, по 10 мин в каждой, и в двух сменах 95% этанола, по 5 мин в каждой, затем высушивают препараты на воздухе.
8. Помещают стекла на 3 мин в 70 мМ NaOH.
9. Проводят дегидратацию в трех сменах 70% этанола, по 10 мин в каждой, и в двух сменах 95% этанола, по 2 мин в каждой, затем высушивают препараты на воздухе.
10. Готовят гибридизационную смесь так, как это описано в протоколе 5.8. Наносят нужное количество смеси на препараты и накрывают их покровными стеклами.
11. Денатурируют препараты в течение 3–5 мин в термостате при температуре примерно 110 °C. Для гарантии температуру у поверхности стекол измеряют термометром (82 °C). Оставляют препараты для гибридизации при 37–42 °C на 40 ч¹⁾.
12. Снимают покровные стекла, помещают препараты в штатив и промывают их в двух сменах прогретого до 37 °C $2 \times \text{SSC}$, по 10 мин в каждой.
13. Промывают препараты в трех сменах прогретого до 37 °C $2 \times \text{SSC}$, по 10 мин в каждой.
14. Проводят дегидратацию в двух сменах 70% этанола, по 10 мин в каждой, и в 95% этаноле 5 мин, затем высушивают препараты на воздухе.
15. Проводят радиоавтографию в соответствии с протоколом 5.8. Для клеток время экспозиции должно быть больше, чем для срезов.

¹⁾ Если при окрашивании появляется фон, то промывают препараты в соответствии с протоколом 5.8.

4.2. Гибридизация ДНК, содержащейся в гистологических срезах, с ³⁵S-ДНК-зондами

Обычно мы обрабатываем в одном опыте 144 препарата, включая контроль. Они нанесены на 48 предметных стекол, помещаемых в штатив.

Протокол 5.8. Гибридизация *in situ* ДНК парафиновых срезов с ^{35}S -зондами

Используют только силиконированные стекла (протокол 5.1). Срезы размещают на трети стекла, удаленной от матового конца.

Материалы

- Протеиназа К: лиофильно высушенный порошок (Boehringer Mannheim)
- ФСБ: 10 мМ фосфатный буфер, 150 мМ NaCl, pH 7,2
- 2 М трис-HCl, pH 7,4
- БСА, очищенный от нуклеаз: 50 мг/мл
- ПВП: 10% (в/о) раствор в дистиллированной воде
- Фиколл: 10% (в/о) раствор в дистиллированной воде
- ДНК-носитель, например рестрицированная ДНК сельди или лосося: 2 мг/мл
- 0,1 М ДТТ
- Деионизованный формамид
- 20 × SSC: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0
- Концентрированный солевой раствор: 0,5 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,4, 1 мМ ЭДТА
- Фотоэмульсия и растворы для проявления (см. п. Д)
- Раствор для промывания препаратов, заменяющий проточную воду: 200 мл воды, в которой растворено 4 г NaHCO_3 и 40 г $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$.

Методика

А. Предварительная обработка препаратов (используют штативы на 20–48 стекол)

1. Прогревают срезы при 60 °С не менее 2 ч или оставляют их при той же температуре на ночь.
2. Удаляют из срезов парафин, используя следующие реактивы:
 - ксилол (обязательно свежий): две смены, по 10 мин в каждой;
 - абсолютный этанол: две смены, по 5 мин в каждой;
 - 95% этанол: две смены, по 5 мин в каждой;
 - 70% этанол: две смены, по 5 мин в каждой.
3. Высушивают срезы на воздухе примерно 10 мин.
4. На каждый срез наносят пипеткой 100–200 мкл раствора протеиназы К (0,5–1,0 мг/мл) и инкубируют 15 мин во влажной камере при 37 °С.

5. Промывают препараты в пяти сменах ФСБ, по 2 мин в каждой, и высушивают их на воздухе.

Б. Приготовление раствора зонда

1. Концентрация зонда (нг/мкл) и его удельная радиоактивность (имп. · мин⁻¹/мкл) должны быть известны из процедуры приготовления раствора¹⁾.

2. Определяют объем раствора, достаточный для нанесения на все препараты при данном размере стекол²⁾.

3. Раствор должен иметь следующие характеристики:

- 1 нг/мкл ДНК
- $2 \cdot 10^8$ имп. · мин⁻¹/мкл

4. Вычисляют необходимый объем маточного раствора зонда, исходя из известного конечного объема (V , мкл) и концентрации зонда в маточном растворе (P , нг/мкл):

- Необходимый объем маточного раствора = V/P

5. Проверяют соответствие удельной радиоактивности требованию п. 3 по следующей формуле³⁾:

- Удельная радиоактивность конечного раствора =
= (имп. · мин⁻¹/мкл) · 10^{-3} = (имп. · мин⁻¹/мкл) · $1/P$

Полученная величина должна быть равна или больше $2 \cdot 10^8$ имп. · мин⁻¹/мкл, в противном случае необходимо увеличить время экспозиции при радиоавтографии.

6. В эппендорфовскую пробирку с 1 мл деионизованного формамида добавляют 0,2 г декстрансульфата, встряхивают и прогревают в водяной бане при 60 °С до растворения.

7. Готовят следующую смесь:

- | | |
|------------------------|---------|
| • 5 М NaCl | 240 мкл |
| • 2 М трис-HCl, pH 7,4 | 10 мкл |
| • 0,5 М ЭДТА | 2 мкл |
| • 50 мг/мл БСА | 40 мкл |
| • 10% (в/о) ПВП | 4 мкл |
| • 10% (в/о) фиколл | 4 мкл |
| • ДНК-носитель 2 мг/мл | 200 мкл |
| • 0,1 М ДТТ | 20 мкл |

Перемешивают смесь встряхиванием.

8. Добавляют раствор декстрансульфата в формамиде (п. 6) и перемешивают встряхиванием. Полученной смеси достаточно для 2000 мкл раствора зонда.

Протокол 5.8 (Продолжение)

9. Добавляют нужный объем маточного раствора зонда и доводят объем до 2 мл дистиллированной водой. Раствор для гибридизации имеет следующий состав: 50% формамид, 10% (в/о) декстрансульфат, 0,6 М NaCl, 0,01 М трис-HCl, pH 7,4, 0,5 мМ ЭДТА, 1 мг/мл (в/о) БСА, 0,02% (в/о) фиколл, 0,02% (в/о) ПВП, 0,2 мг/мл ДНК спермы лосося, 0,5 мМ ДТТ.

В. Гибридизация

1. Наносят на срезы нужное количество раствора зонда (15–30 мкл) и сразу же закрывают их покровными стеклами.
2. Запаявают стекла в пластиковый пакет и инкубируют примерно 6 мин при 110–120 °С (чтобы произошла денатурация зонда и ДНК-мишени), пока температура стекол не достигнет 93 °С (ее контролируют с помощью термометра, помещенного в непосредственной близости со стеклами). Вынимают стекла.
3. Промазывают стекла по краям резиновым клеем, используя шприц без иглы.
4. Запаявают стекла в пластиковый пакет, в который налито немного раствора с такой же концентрацией солей, как у буфера для гибридизации. Инкубируют 40 ч при 37–50 °С в зависимости от жесткости условий гибридизации.
5. С помощью иглы подцепляют и одним движением снимают покровное стекло; сразу же опускают препарат в первую смену раствора для промывания.

Г. Промывание препаратов

1. Промывают препараты в трех сменах раствора, содержащего 2 × SSC, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ДТТ, по 5 мин в каждой.
2. Промывают препараты в двух сменах раствора, содержащего 0,5 × SSC, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ ДТТ, по 5 мин в каждой.
3. Промывают препараты в двух сменах раствора, содержащего 0,5 × SSC, 1 мМ ЭДТА, по 5 мин в каждой.
4. Промывают препараты, помещенные в штатив, в смеси 50% формамида и 50% концентрированного солевого раствора (см. *Материалы*) в течение 10 мин.
5. Промывают препараты в четырех сменах 0,5 × SSC при 55 °С, по 5 мин в каждой.
6. Промывают препараты в 0,5 × SSC в течение 5 мин при комнатной температуре.

7. Дегидратируют препараты в 70% этаноле и в 95% этаноле, по 5 мин в каждом.
8. Высушивают стекла на воздухе.

Д. Радиоавтография

1. Закрепляют стекла в пластиковых штативах.
 2. Подготавливают следующие посуду и препараты:
 - светонепроницаемую коробку для штатива со стеклами;
 - стакан объемом 50 мл;
 - флакон с фотоэмульсией Kodak № 165-4441;
 - шпатель и бюхнеровскую газовую горелку;
 - стакан объемом 50 мл с 25 мл 0,6 М ацетата аммония.
 3. Выключают свет, достают из коробки флакон с фотоэмульсией и помещают его в водяную баню на 50 °С, чтобы эмульсия расплавилась.
 4. При красном свете (фильтр № 2) заполняют стакан с ацетатом аммония фотоэмульсией доверху и осторожно перемешивают шпателем.
 5. Над горелкой переливают эту смесь в пустой стакан, чтобы удалить пузырьки воздуха.
 6. На секунду опускают штатив со стеклами в эмульсию и промокают края стекол фильтровальной бумагой. Помещают штатив в коробку и оставляют сохнуть до утра.
 7. Насыпают на дно коробки силикагель и продолжают экспонировать при 4 °С в течение 3–7 сут в зависимости от удельной радиоактивности зонда и количества ДНК-мишени.
 8. Проявляют препараты в темноте, поочередно инкубируя их в следующих растворах:
 - проявитель (D-19, Kodak): 5 мин при 15 °С;
 - фиксатор А (Kodak 3000): несколько секунд;
 - быстрый фиксатор: 5 мин;
 - вода: 5 мин.
- Включают свет.
9. На 1–2 мин опускают стекла в раствор гематоксилина Джилла.
 10. Опускают стекла на 2 мин в сосуд с большим количеством воды.
 11. Промывают препараты в проточной воде.

Протокол 5.8 (Продолжение)

12. Дегидратируют препараты в трех сменах 70%, 95% и абсолютного этанола, по 3 мин в каждой, затем в двух сменах ксилола, по 10 мин в каждой, и заключают их в среду типа Permount.

¹⁾ Если зонд приготовлен несколько недель назад, то его удельную радиоактивность измеряют, налив 1 мкл раствора во флакон с 4 мл сцинтиллятора; используют счетчик для ¹⁴C. Текущую радиоактивность зонда можно также определить, исходя из периода полураспада ³⁵S.

²⁾ Для стекол размером 20 × 40 мм берут 35 мкл раствора зонда; 22 × 30 мм — 25 мкл; 22 × 22 мм — 21 мкл; диаметром 18 мм — 12 мкл; диаметром 12 мм — 5 мкл, 20% от этого объема добавляют во избежание ошибки.

³⁾ Эта формула выводится следующим образом:

• Удельная радиоактивность зонда	=	имп. · мин ⁻¹ /мкг ДНК
• Радиоактивность на единицу объема	=	имп. · мин ⁻¹ /мкл
• Суммарная радиоактивность добавленного зонда	=	(имп. · мин ⁻¹ /мкг) · P · 10 ⁻³ =
	=	Взятый объем маточного раствора (имп. · мин ⁻¹ /мкг) · P · 10 ⁻³ =
	=	V/P (имп. · мин ⁻¹ /мкг) · P · 10 ⁻³ =
	=	V · 10 ⁻³ · имп. · мин ⁻¹ /мкг
• Удельная радиоактивность конечного раствора	=	Суммарная радиоактивность имп. · мин ⁻¹ /Конечный объем =
	=	$\frac{V \cdot 10^{-3} (\text{имп.} \cdot \text{мин}^{-1}/\text{мкг})}{V} =$
	=	(имп. · мин ⁻¹ /мкг) · 10 ⁻³ .

4.3. Гибридизация РНК, содержащейся в тканевых срезах, с ³⁵S-РНК-зондами

Можно использовать как замороженные, так и парафиновые срезы. Следует, однако, помнить, что РНК очень чувствительна к действию фиксаторов: длительная фиксация биоптатов в формалине может привести к полному ее разрушению [10, 13], поэтому лучше применять замороженные срезы. Процедура гибридизации описана в протоколе 5.9.

Протокол 5.9. Гибридизация in situ РНК замороженных срезов с ³⁵S-РНК-зондами

Работая со стеклами, надевают перчатки. Используют воду, обработанную ДЭПК (гл. 8), и стерильные маточные растворы реагентов при комнатной температуре.

Материалы

См. также протоколы 5.7 и 5.8.

- Тритон X-100
- 20 × SSPE: 3,6 М NaCl, 0,2 М Na₂PO₄, 0,02 М ЭДТА, pH 7,2
- Дрожжевая tPHK: 10 мг/мл
- Буфер для промывания: 6 × SSPE, 50% формамид
- Буфер НТЭ: 0,5 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА
- Раствор РНКазы: маточный раствор (10 мг/мл), прокипяченный перед использованием

Методика

А. Приготовление срезов (см. разд. 2.2.3, где обсуждается фиксация срезов)

1. Фиксируют ткань 4% (в/о) параформальдегидом, растворенным в ФСБ.
2. Готовят толстые срезы (4–6 мкм) и помещают их на силиконированные предметные стекла (см. протокол 5.1).
3. Высушивают срезы на воздухе.
4. Обрабатывают препараты 0,2% тритоном X-100 в ФСБ в течение 15 мин.
5. Промывают в двух сменах ФСБ, по 3 мин в каждой.

Б. Обработка срезов перед гибридизацией

1. Наносят на срезы раствор протеиназы К (1–10 мкг/мл) и инкубируют препараты во влажной камере при 37 °С в течение 15 мин.
2. Промывают препараты в двух сменах ФСБ, по 3 мин в каждой.
3. Промывают препараты в 0,1 М ТЭА, pH 8,0, 3 мин, а затем добавляют уксусный ангидрид (3 мкл на 300 мл раствора) и инкубируют 10 мин при комнатной температуре (см. п. 5 протокола 5.7).
4. Дважды по 2 мин промывают препараты в 2 × SSC.
5. Дегидратируют препараты в батарее спиртов: 50%, 70%, 95% и абсолютном этаноле, по 3 мин в каждом, затем высушивают на воздухе.

В. Гибридизация

1. Готовят следующую смесь.

• Деионизованный формамид	1 мл
• Декстрансульфат	0,2 г
• 20 × SSPE	0,6 мл
• Дрожжевая tPHK (10 мг/мл)	0,2 мл

Этого объема достаточно для получения 2 мл раствора зонда.

Протокол 5.9 (Продолжение)

2. Добавляют нужный объем раствора зонда, так чтобы конечная его концентрация составила 0,3 нг/мкл, и доводят объем до 2 мл водой, обработанной ДЭПК. Радиоактивность зонда на препарат должна составлять $(1-5) \cdot 10^5$ имп. · мин⁻¹.
3. Наносят зонд на срез, накрывают покровным стеклом и по периметру обмазывают стекла резиновым клеем (протокол 5.8).
4. Инкубируют в герметичной камере с высокой влажностью при 50 °С; время инкубации подбирают опытным путем.
5. Снимают покровные стекла, как это описано в протоколе 5.8.

Г. Промывание препаратов

1. Помещают препараты в штатив и погружают их на 1 ч в буфер 1 × НТЭ (см. *Материалы*) при 50 °С.
2. Помещают препараты в свежий 1 × НТЭ еще на 1 ч.
3. Переносят препараты в 0,5 × НТЭ и выдерживают при 37 °С в течение 5 мин.
4. Переносят препараты в 0,5 × НТЭ, содержащий РНКазу (20 мкг/мл), и выдерживают при 37 °С в течение 30 мин.
5. Промывают препараты (в общей сложности в течение 30 мин) при 37 °С в пяти сменах 0,5 × НТЭ, содержащем ДТТ (добавляют к 250 мл НТЭ 250 мкл 1 М ДТТ).
6. Дегидратируют препараты в батарее спиртов: 50%, 70%, 95%, абсолютный этанол, по 3 мин в каждом.
7. Высушивают препараты на воздухе и проводят радиоавтографию (см. протокол 5.8).

4.4. Гибридизация с биотинилированными ДНК-зондами

Последние несколько лет мы использовали для гибридизации *in situ* биотинилированные зонды, поскольку обнаружилось, что применение комплекса биотин—стрептавидин—кислая фосфатаза дает по крайней мере не худшие результаты, чем ³⁵S-зондов [12]. Этот метод пригоден для исследования цитологических препаратов, замороженных срезов и препаратов, фиксированных формалином и заключенных в парафин. Обработку замороженных срезов в соответствии с протоколом 5.10 начинают с протеолиза протеиназой К, но в более мягких условиях, при концентрации фермента 1–100 мкг/мл. Денатурацию проводят в течение всего 3–5 мин при 82 °С, а инкубацию с субстратом — в течение 10–30 мин,

тоже гораздо меньше времени, чем обычно. Режим проявления красителя во время инкубации следует подбирать индивидуально, чтобы избежать неспецифического фоновых окрашивания.

Протокол 5.10. Гибридизация in situ ДНК парафиновых срезов с биотинилированными зондами

Материалы

См. протоколы 5.7–5.9.

Методика

А. Предварительная обработка срезов

1. Удаляют из срезов парафин, как это описано в протоколе 5.8.
2. Высушивают на воздухе, наносят на срезы раствор протеиназы К (0,5 мг/мл в ФСБ) и инкубируют в камере с высокой влажностью при 37 °С в течение 10–15 мин (см. протокол 5.8).
3. Промывают срезы в трех сменах ФСБ, по 3 мин в каждой, и высушивают их на воздухе.

Б. Гибридизация

1. Растворяют 0,2 г декстрансульфата в 1 мл деионизованного формамида, как это описано в протоколе 5.8.
2. Готовят раствор для гибридизации, смешивая следующие компоненты:

• 20 × SSC	200 мкл
• ДНК спермы сельди, 2 мг/мл	400 мкл

Встряхивают смесь, добавляют раствор декстрансульфата в формамиде и еще раз перемешивают встряхиванием.

3. Приготовленной смеси достаточно для получения 2 мл раствора зонда; она составляет примерно 80% объема этого раствора.
4. Добавляют такое количество исходного раствора зонда, чтобы его конечная концентрация составила 2 мкг/мл, и доводят объем стерильной дистиллированной водой до 2 мл. Конечные концентрации должны быть следующими: 50% формамид, 2 × SSC, 10% декстрансульфат, 0,4 мг/мл ДНК спермы сельди.
5. Наносят 15–30 мкл раствора зонда на срез и сразу же накрывают его покровным стеклом подходящего размера.
6. Помещают препараты в пластиковый пакет, запаивают его и инкубируют при 110–120 °С примерно 6 мин, пока температура на поверхности стекла, контролируемая специальным датчиком, не достигнет 93 °С. Переносят стекла в комнатную температуру.

Протокол 5.10 (Продолжение)

7. С помощью шприца без иглы обмазывают по краям предметные стекла вместе с покровными резиновым клеем.
8. Помещают препараты в герметичную камеру и инкубируют при 37–50 °С, в зависимости от жесткости условий гибридизации, в течение ночи¹⁾. На дно камеры наливают немного буфера для гибридизации, чтобы атмосфера была насыщена его парами и препараты не подсыхали.
9. Снимают покровные стекла, как это описано в протоколе 5.8.

В. Промывание препаратов

1. Промывают препараты в двух сменах $2 \times \text{SSC}$, по 5 мин в каждой.
2. Промывают препараты в трех сменах $0,2 \times \text{SSC}$ при 37–50 °С, по 5 мин в каждой.
3. Еще раз промывают препараты в $2 \times \text{SSC}$ при комнатной температуре в течение 5 мин.

Г. Детекция

Материалы

- Буфер для промывания А: 1 М NaCl, 0,1 М трис-HCl, pH 7,5, 0,05% тритон X-100
- Буфер для промывания В: 0,1 М NaCl, 0,1 М трис-HCl, pH 9,5

Методика

1. С помощью пипетки наносят на препараты стрептавидин, конъюгированный с щелочной фосфатазой, и помещают их на 30 мин в камеру с высокой влажностью при 37 °С. Мы используем конъюгат фирмы Amersham, который разведен буфером А, содержащим 0,05% твин-20, в соотношении 1 : 200.
2. Промывают препараты в трех сменах буфера А²⁾, по 3 мин в каждой.
3. Промывают препараты в трех сменах буфера В, по 3 мин в каждой.
4. Инкубируют препараты 30–60 мин при 37 °С³⁾ в растворе субстрата НСТ/БХИФ (см. гл. 4).
5. Останавливают инкубацию, промывая препараты в трех сменах воды, по 3 мин в каждой.
6. При необходимости контрастируют препараты подходящим красителем.
7. Дегидратируют препараты в батарее спиртов: 70%, 95%, абсолютный этанол, по 3 мин в каждом, затем проводят через две смены ксилола.

8. Покрывают препараты водорастворимой средой, например глицериновым желе (см. гл. 4).

¹⁾ При более высоких концентрациях зонда гибридизацию можно проводить в течение 2 ч.

²⁾ В большинстве работ подчеркивается, что для сохранения активности щелочной фосфатазы в среде обязательно должен присутствовать $MgCl_2$. Однако мы обнаружили, что $MgCl_2$ не влияет на гибридизационный сигнал.

³⁾ Через 10 мин после начала окрашивания можно проверить интенсивность реакции и затем контролировать ход реакции каждые 10 мин. Если фона нет, то можно продолжать инкубацию с субстратом в течение нескольких часов; это повышает чувствительность метода.

5. Интерпретация результатов

Гибридизационный сигнал представляет собой скопление отдельных или сливающихся зерен (если используется изотопная метка) либо окрашенный преципитат, локализованный в цитоплазме, ядре или перинуклеарной области (рис. 5.2). При выявлении вируса папилломы человека обычно наблюдается фокальное



Рис. 5.2. Гибридизация in situ с эпителиальными клетками шейки матки, инфицированными HPV типа 11. Биоптат в течение 2 сут фиксировали в формалине. Фон минимальный. Отчетливо видны две позитивные клетки, остальные клетки не окрашены; $\times 1000$.



Рис. 5.3. Гибридизация *in situ* для выявления HPV в биоптате шейки матки, фиксированном формалином. Срез гибридизовали с ^{35}S -ДНК HPV 16. В верхних слоях эпителия обнаруживается сильный гибридизационный сигнал. Биоптат со слабой дисплазией.

окрашивание: одни клетки отчетливо позитивные, другие негативные (рис. 5.1–5.3). Фоновое окрашивание очень слабое, диффузное и неравномерное. Если вирусные последовательности локализуются в ядре, то обычно видны два типа сигналов: диффузно распределенные зерна (рис. 5.2) и плотные внутриядерные скопления зерен (если используется изотопная метка) (рис. 5.3). Интенсивность окрашивания можно использовать в качестве грубого критерия для оценки содержания ДНК-мишени в препарате. Высокая плотность метки говорит о наличии от нескольких сотен до тысячи и более копий искомой последовательности (рис. 5.4).

6. Количественная оценка

Плотность зерен после радиоавтографии можно оценить либо чисто визуально (конечно, это будет очень грубая оценка), либо путем прямого подсчета зерен, что требует много времени. В последнее время для этих целей используют автоматические анализаторы изображения, дающие высокое разрешение [13, 37].

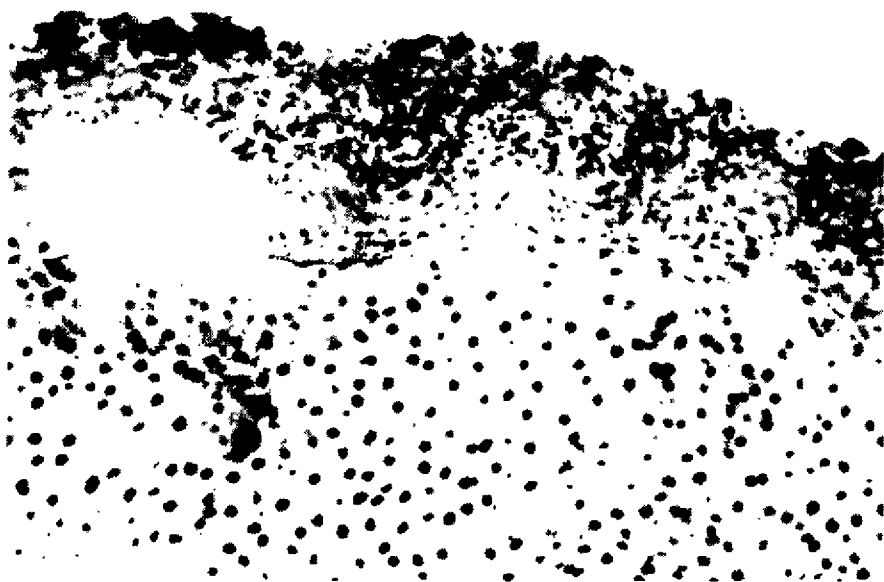


Рис. 5.4. Гибридизация с биоптатом, взятым от больного волосистой лейкоплакией. Срез гибридизовали с биотинилированным EBV-зондом, клонированным в рBR322. Видно интенсивное гомогенное окрашивание клеток цилиндрического эпителия. Обратите внимание на неспецифическую перекрестную гибридизацию рBR322 с *Candida albicans*, присутствующими в гиперкератозном слое эпителия.

7. Чувствительность метода ГИС

Число копий вирусного генома в одной и той же ткани варьирует, что затрудняет сравнение чувствительности разных методов гибридизации (рис. 5.5). Единственная возможность — использование клеточных линий, содержащих известное число копий ДНК-мишеней на клетку [12, 14]. Сравнение проводили на инфицированных вирусом папилломы человека (HPV) клеточных линиях CaSki (500–600 копий ДНК HPV 16), HeLa (20–50 копий ДНК HPV 18) и SiHa (1 копия ДНК HPV 16). Оказалось, что чувствительность метода при работе с ДНК-зондами, меченными ^{35}S , варьирует от 20 до 100 копий на клетку, а с биотинилированными ДНК-зондами — от 800 копий на клетку до величин, сравнимых или даже более высоких, чем для зондов, меченных ^{35}S . Такая высокая вариабельность в последнем случае обуславливается не природой метки, а тем, что используются разные системы детекции [9, 12, 17, 32]. Метод гибридизации с РНК-зондами более чувствителен, чем с ДНК.

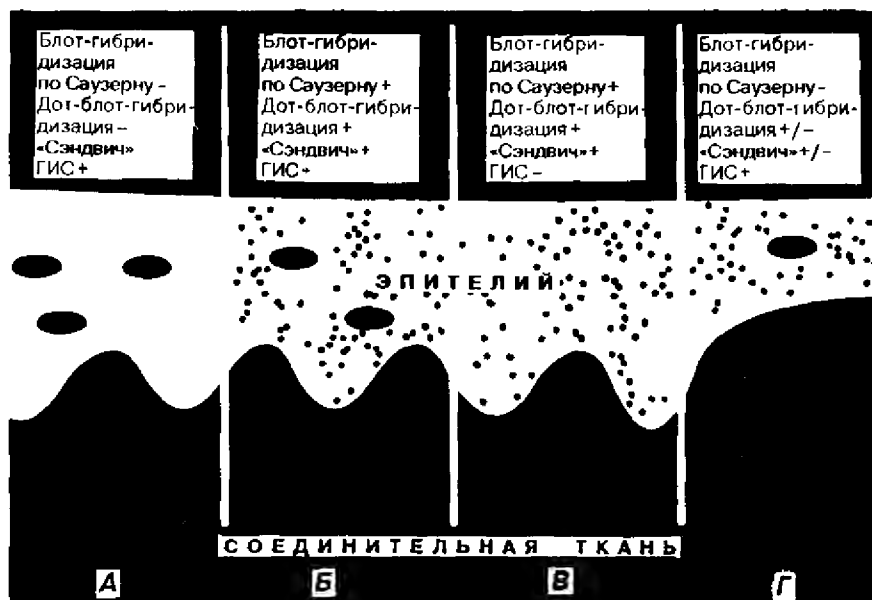


Рис. 5.5. Сравнение чувствительности разных методов гибридизации при выявлении ДНК HPV в эпителиальных клетках. **А.** ДНК HPV содержится только в трех клетках, по 20–50 копий на клетку. Это количество ДНК можно обнаружить только с помощью гибридизации *in situ*. **Б.** Несколько клеток содержат ДНК HPV в количестве более 20–50 копий на клетку, в других клетках эта ДНК присутствует в меньшем количестве. Все методы дают положительный результат. **В.** Большинство клеток биоптата содержат только по несколько копий ДНК HPV. Чувствительность метода гибридизации *in situ* недостаточна, а другие методы дают положительный результат. **Г.** Биоптат представляет собой соединительную ткань с небольшой примесью эпителиальных клеток. Только одна эпителиальная клетка содержит в большом количестве ДНК HPV: 100–1000 копий. Гибридизация *in situ* дает положительный результат, а блот-гибридизация по Саузерну — отрицательный вследствие маскирующего эффекта суммарной ДНК препарата. Два других метода могут давать как положительный, так и отрицательный результат.

8. Проблемы, возникающие при гибридизации *in situ*

Наиболее распространенные проблемы, возникающие при гибридизации *in situ* с радиоактивными и биотинилированными зондами, суммированы в табл. 5.3. При работе с биотинилированными зондами эти проблемы могут быть связаны с наличием в

Таблица 5.3. Проблемы, возникающие при гибридизации in situ

Проблема	Возможные причины
Отлипание срезов от стекла	Стекла не обработаны надлежащим образом Слишком продолжительный протеолиз или слишком высокая температура денатурации
Плохая морфология	Неправильная фиксация Слишком продолжительный протеолиз или слишком высокая температура денатурации
Отсутствие гибридизационного сигнала в положительном контроле	Неправильно выбрана температура инкубации и/или денатурации препаратов
Наличие гибридизационного сигнала в отрицательном контроле	Неправильное промывание препаратов (см. также «Высокий фон») Сморщивание ткани
Высокий фон	Неправильно приготовлены раствор субстрата или фотоэмульсия Неполное депарафинирование Слишком высокая температура денатурации Плохо промытые срезы Слишком длительная инкубация с субстратом и радиоавтография Подсыхание срезов во время гибридизации
Слишком слабый специфический гибридизационный сигнал	Недостаточное количество ДНК-мишени Слишком низкая температура при протеолизе, гибридизации и/или инкубации с субстратом Малое время инкубации с субстратом и/или гибридизации

препарате эндогенного биотина, особенно в нервной, опухолевой и железистой тканях. Их можно решить, последовательно инкубируя срезы перед гибридизацией со стрептавидином (1 мг/мл, 20 мин) и биотином (0,1 мг/мл, 20 мин). Неспецифическое фоновое окрашивание, обусловленное присутствием в тканях гликогена, предотвращают предварительной обработкой срезов амилазой. Эндогенную кислую фосфатазу блокируют левамизолом, при этом для практически полного блокирования достаточно присутствия левамизола в растворе субстрата в концентрации 10 мМ. Ложноположительное окрашивание может обуславливаться также гибридизацией с клеточной ДНК человека последовательностей вектора на основе бактериальной плазмиды, который использовался для клонирования зонда. Имеются также много-

численные данные о гибридизации между плазмидой pBR322 и бактериальной ДНК, например ДНК *Candida albicans* (рис. 5.4). Чтобы обойти эти трудности, следует провести дополнительную очистку препарата зонда от векторной ДНК. Биоптаты, используемые в качестве отрицательного контроля (например, при выявлении вирусов), должны быть получены от больных, неинфицированных, чья инфицированность проверена по четким клиническим, серологическим и гистологическим критериям. Основным недостатком метода гибридизации *in situ* состоял в том, что его чувствительность до недавних пор не превышала 20–100 генов или эквивалентных им геномных последовательностей на клетку. В настоящее время удастся обнаружить от 2,5 до 12 копий HPV-геномов на клетку [25], но инфекция может развиваться и при меньшем числе копий, а выявить ее с помощью гибридизации *in situ* (рис. 5.5) не удастся. По-видимому, дело здесь не в самих зондах, а в невозможности «генерировать» и зарегистрировать гибридизационный сигнал.

9. Применение гибридизации *in situ* в клинической диагностике

Методы гибридизации *in situ* позволяют диагностировать многие вирусные инфекции [5, 7, 23, 37]. С их помощью можно обнаруживать вирусные нуклеиновые кислоты и определять их содержание, а значит, проводить эпидемиологические исследования на молекулярном уровне. Благодаря своей высокой специфичности и скорости ГИС является ценным дополнением к традиционным методам, использующимся в вирусологии: инфицированию подходящих клеток, размножению вируса в культуре ткани, электронной микроскопии образцов ткани, серологическому анализу вирусных антигенов. Большое преимущество метода состоит в том, что он позволяет обнаруживать микроорганизмы при латентной инфекции (например, вирус герпеса) или микроорганизмы, которые трудно (аденовирусы и вирусы JC) или пока невозможно (вирус папилломы и вирус гепатита В) культивировать *in vitro*. Кроме того, для гибридизации можно использовать препараты, фиксированные формалином, или эпителиальные клетки слизистой, которые не составляет труда получить. В продаже появляются все новые зонды для гибридизации, и, по-видимому, все больше лабораторий будут использовать этот метод в диагностических целях.

9.1. Вирус папилломы человека

Как показывают молекулярно-биологические исследования, вирус папилломы человека (HPV) может индуцировать развитие рака шейки матки и других генитальных новообразований (см. обзор [38]): по имеющимся данным, ДНК HPV присутствует примерно в 80% опухолей шейки матки. В настоящее время известно около 70 типов HPV, которые инфицируют клетки кожи или слизистых. Некоторые из них (например, HPV 16, 18, 31 и 33) особенно характерны для раковых и предраковых состояний (рис. 5.3 и 5.6). Адекватные серологические тесты на эти вирусы отсутствуют, и их не удается выделить из клинических препаратов культивированием. Иммуноцитохимическими методами можно идентифицировать капсидные антигены HPV, но только в случае продуктивной инфекции. До недавнего времени для диагностики папилломавирусных инфекций применялись исключительно гистологические методы. Цитологическая диагностика, основанная на классическом койлоцитозе и дискератозе, по мнению некото-



Рис. 5.6. Гибридизация биоптата шейки матки с биотинилированной ДНК HPV 16 в качестве зонда. Биоптат фиксировали формалином и заключили в парафин. Интенсивный гибридационный сигнал наблюдается даже в нижних слоях эпителия.

рых авторов, не может считаться удовлетворительной. На сегодня гибридизация *in situ* — это оптимальный метод диагностики HPV-инфекции [39], и во многих случаях он является методом выбора, а иногда и единственным методом, например, если лишь небольшое число опухолевых клеток содержит ДНК HPV (рис. 5.5). Ложноположительные гибридизационные сигналы распознаются без особого труда. Для простого обнаружения HPV-геномов гибридизацию обычно проводят в мягких условиях, но некоторые типы HPV выявляются только при гибридизации в жестких условиях, при температурах от $T_m - 7^\circ\text{C}$ до $T_m - 10^\circ\text{C}$. Важно помнить, что при гибридизации *in situ* перекрестная гибридизация наблюдается чаще, чем в случае других методов при аналогичных условиях [40, 41]. Об истинной двойной инфекции можно говорить лишь в том случае, когда гибридизационные сигналы, отвечающие двум типам HPV, обнаруживаются в совершенно разных участках одного биоптата.

9.2. Цитомегаловирус

Цитомегаловирус (CMV) относится к роду герпесвирусов и часто является возбудителем внутриутробных инфекций, приводящих к врожденным уродствам. У больных с ослабленным иммунитетом цитомегаловирусная инфекция может приводить к самым разным заболеваниям: пневмонии, ретиниту, гепатиту, колиту, энцефалопатии. Как правило, CMV-инфекции легко диагностируются обычными гистологическими методами по характерным включениям вирусных частиц. Однако ДНК CMV обнаруживаются также во многих нормальных по виду клетках и тканях, где цитомегаловирусных частиц мало или они вообще отсутствуют. Для диагностики таких «скрытых» CMV-инфекций, часто не выявляющихся при обычном гистологическом исследовании, полезно использовать гибридизацию *in situ* [42, 43]. Этот метод более чувствителен, чем обычные цитологические методы, а в ряде случаев — более чувствительный и быстрый, чем вирусное культивирование. Однако следует очень тщательно подбирать зонд для гибридизации, поскольку в геноме CMV имеются протяженные участки, спаривающиеся с ДНК человека.

9.3. Вирус простого герпеса

Инфицирование человека вирусом простого герпеса (HSV) типов 1 и 2 распространено очень широко. После заражения вирус находится в клетке-хозяине, главным образом в клетках сенсорного ганглия, в латентной форме. Он вызывает кератит, энцефа-

лит, рецидивирующие острые респираторные заболевания, рецидивирующий герпес гениталий, а у больных с ослабленным иммунитетом — более тяжелые болезни. С помощью гибридизации *in situ* можно разграничить инфекции, вызванные HSV1 и HSV2 [44]. Однако зонды для гибридизации следует при этом подбирать очень тщательно, поскольку геном HSV1 частично гибридизуется с геномом HSV2, а ДНК герпесвирусов проявляет гомологию с клеточной ДНК (мРНК) человека [45]. Во всех случаях необходимо ставить контрольные опыты; кроме того, лучше использовать для гибридизации короткие зонды.

9.4. Вирус Эпштейна—Барр

Вирус Эпштейна—Барр (EBV) распространен повсеместно и способен вызывать персистирующую инфекцию, напоминающую своим клиническим проявлением простудные заболевания или инфекционный мононуклеоз. Установлена связь EBV с назофарингиальной карциномой и лимфомой Беркитта. У лиц с ослабленным иммунитетом EBV участвует в патогенезе В-клеточных лимфом. Недавно появились данные о связи EBV с волосистой лейкоплакией, которая часто развивается у больных СПИДом (рис. 5.4). С помощью гибридизации *in situ* удалось локализовать EBV в клетках лимфомы Беркитта, в эпителиальных клетках носоглотки при карциноме и в гранулярных и шиповидных эпителиальных клетках при волосистой лейкоплакии [46, 47]. Однако содержание вирусных частиц в опухолевых клетках может быть настолько мало, что обнаружить EBV методом гибридизации *in situ* не удастся.

9.5. Вирус гепатита В

Известно несколько форм инфекционного гепатита. Хорошо охарактеризован вирус гепатита В (HBV), для выявления которого имеются специфические серологические тесты. Это небольшой ДНК-содержащий вирус, с трудом поддающийся культивированию. По оценкам, во всем мире насчитывается примерно 200 млн. носителей HBV; они служат резервуаром инфекции. Риск развития гепатоцеллюлярного рака у носителей HBV в 200 раз выше, чем у других людей [48]. С помощью гибридизации *in situ* HBV-геномы были обнаружены не только в инфицированных вирусом гепатоцитах, но и в эпителиальных клетках желчных протоков, в эндотелии и гладких мышцах. Это говорит о том, что круг клеток-хозяев HBV шире, чем предполагалось ранее [49]. В самой печени инфицированные гепатоциты можно обнаружить в непосредственной

близости от неокрашивающихся клеток, а содержание ДНК HBV в активной зоне гепатита, по-видимому, намного выше, чем в соседствующих с ней раковых клетках. Наличие в клетках ДНК HBV четко коррелирует с присутствием вирусного антигена в гепатоцитах, корового антигена в сыворотке и с циррозом, выявляемым гистологическими методами. В ряде случаев, несмотря на наличие поверхностного антигена вируса гепатита В (HB_sAg), результаты гибридизации оказываются отрицательными. Возможно, это связано с тем, что метод ГИС позволяет обнаружить вирусный геном, только если он присутствует не менее чем в 10 копиях на клетку. По-видимому, клетки, содержащие меньше 10 копий, все же синтезируют HB_sAg и другие вирусные белки, несмотря на низкий уровень репликации вирусного генома. И наоборот, гораздо более чувствительные методы гибридизации позволят обнаружить ДНК HBV при латентной инфекции, когда HB_sAg синтезируется слишком мало, чтобы его можно было определить стандартными методами [5]. Например, гибридизацией *in situ* с использованием биотинилированного зонда нам удалось обнаружить ДНК HBV у трех серологически негативных больных — веский аргумент в пользу применения данного метода в целях клинической диагностики.

9.6. Вирус иммунодефицита человека

Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) относится к ретровирусам, чей РНК-геном может встраиваться в хромосомы клетки-хозяина в виде кДНК и находится в латентном состоянии, когда вирусные белки, выявляемые иммуноцитохимическими методами, не синтезируются. Идентифицировать инфицированные клетки и точно определить их число в препарате можно в этом случае только методом ГИС. Так, с помощью этого метода было показано, что в периферической крови ВИЧ-инфицированных больных вирус активно амплифицируется лишь в очень небольшом числе клеток: 1 на 10^4 — 10^5 [50, 51]. Кроме того, методом гибридизации *in situ* можно показать, что те или иные патологические изменения или клинические симптомы действительно ассоциированы с ВИЧ-инфекцией. Проводя гибридизацию вирусных зондов с большим набором препаратов, полученных от больных СПИДом, можно получить совершенно новые данные о патогенезе этого заболевания, а применяя для гибридизации другие доступные зонды, например ДНК CMV и EBV, можно исследовать патогенез таких сопутствующих СПИДу заболеваний, как саркома Капоши, лимфома и пневмония.

9.7. Другие вирусы

Данные о применении гибридизации in situ для выявления других вирусов весьма немногочисленны и соответствующие исследования проводились в основном в научных целях. Например, сообщалось об исследовании этим методом ткани головного мозга больного с прогрессирующей лейкоэнцефалопатией, предпринятым для выявления ДНК вируса JC [52]. Предполагается исследовать подобным образом и другие дегенеративные неврологические заболевания с известной или предполагаемой вирусной этиологией: болезнь Альцгеймера, рассеянный склероз, болезнь Крейтцфельда—Якоба и другие. Исследование этих неврологических заболеваний с отсроченной манифестацией особенно ценно, поскольку может прояснить их патогенез. По-видимому, методы гибридизации in situ будут все шире применяться для исследования вирусных инфекций с большим инкубационным периодом, особенно в тех случаях, когда специфические белковые маркеры либо не выявлены, либо синтезируются в очень малом количестве.

Литература

1. Pardue M. L. (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 600.
2. John H., Birnstiel M., Jones K. (1969). *Nature (Lond.)*, **223**, 582.
3. Brigati D. J., Myerson D., Leary J. J., Spalholz, Travis S. Z. et. al. (1983). *Virology*, **126**, 32.
4. Fenoglio-Preiser C. M., Willman C. L. (1987). *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **111**, 601–619.
5. Grody W. W., Cheng I., Lewin K. J. (1987). *Human Pathol.*, **18**, 535.
6. Burns, J., Graham A. K., Frank C., Fleming K. A., Evans M. F., McGee J. O'D. (1987). *J. Clin. Pathol.*, **40**, 858.
7. McDougall J. K. (1988). *ISI Atlas of Science: Biochemistry*, **5**.
8. Coghlan J. P., Aldred P., Haralambidis J., Niall H. D., Penschow J. D., Tregear G. W. (1985). *Anal. Biochem.*, **149**, 1.
9. Seyda M., Scheele T., Neumann R., Krueger G. R. F. (1989). *Path. Res. Pract.*, **184**, 18.
10. Simmons D. M., Arriza J. L., Swanson L. W. (1989). *J. Histochemol.*, **3**, 169.
11. Kiyana H., Emson P. C., Tohyama M. (1990). *Neurosci. Res.*, **9**, 1.
12. Syrjänen S., Partanen P., Mantylä R., Syrjänen K. (1988). *J. Virol. Meth.*, **19**, 225.
13. Harrison P. J., Pearson R. C. A. (1990). *Prog. Neurobiol.*, **34**, 271.
14. Unger E. R., Hammer M. L., Chenggis M. L. (1991). *J. Histochem. Cytochem.*, **39**, 145.
15. Tourtellotte W. W., Verity A. N., Schmid P., Martinez S., Shapshak P. (1987). *J. Virol. Meth.*, **15**, 87.
16. McAllister H. A., Rock D. L. (1985). *J. Histochem. Cytochem.*, **33**, 1026.
17. Mullink H., Walboomers J. M. M., Tadema T. M., Jansen D. J., Meyer C. J. L. M. (1989). *J. Histochem. Cytochem.*, **5**, 603.
18. Nuovo G. J., Richart R. M. (1989). *Am. J. Pathol.*, **134**, 837.
19. Syrjänen S., Syrjänen K. (1986). *J. Virol. Meth.*, **14**, 293.
20. Syrjänen S., Syrjänen K., Mantylä R. (1986). *Arch. Gynecol.*, **239**, 39.

21. Höfler H. (1987). *Path. Res. Pract.*, **182**, 421.
22. Pardue M. L. (1985). In: *Nucleic acid hybridization: a practical approach* (ed. B. D. Hames and S. J. Higgins), pp. 179–202. IRL Press, Oxford.
23. Pereira H. G. (1987). *BioEssays*, **4**(3), 110.
24. Syrjänen S., Partanen P., Syrjänen K. (1987). *Cancer Cells* **5**, Papillomaviruses, 329.
25. Herrington C. S., Graham A. K., McGee J. O'D. (1991). *J. Clin. Pathol.*, **44**, 33.
26. Arrand J. E. (1985). In: *Nucleic acid hybridization: a practical approach* (ed. B. D. Hames and S. J. Higgins), pp. 17–46, IRL Press, Oxford.
27. Guinény A.-F., Fouque B., Mougin C., Teoule R., Bloch B. (1988). *J. Histochem. Cytochem.*, **36**, 563.
28. Larsson L.-T., Christensen T., Dalboge H. (1988). *Histochem.*, **89**, 109.
29. Lo Y.-M. D., Mehal W. Z., Fleming K. A. (1988). *Nucleic Acid Res.*, **16**, 8719.
30. Syrjänen S., Andersson B., Juntunen L., Syrjänen K. (1991). *J. Virol. Meth.*, **31**, 147.
31. Britten R. J., Davidson E. H. (1985). In: *Nucleic acid hybridization: a practical approach* (ed. B. D. Hames and S. J. Higgins), pp. 1–16, IRL Press, Oxford.
32. Herrington C. S., Burns J., Graham A. K., Bhatt B., McGee J. O'D. (1989). *J. Clin. Pathol.*, **42**, 601.
33. Niedobitek G., Finn T., Herbst H., Stein H. (1989). *Path. Res. Pract.*, **184**, 343.
34. Mullink H., Walboomers J. M. M., Raap A. K., Meyer C. J. L. M. (1989). *Histochemistry*, **91**, 195.
35. Nederlof P. O., Robinson D., Abuknesha R., Wiegant J., Hopman A. H. N., Tanke H. J., Raap A. K. (1989). *Cytometry*, **10**, 20.
36. Unger E. R., Brigati D. J., Chenggis M. L., Budgeon L. R., Koebler D., Cuomo C., Kennedy T. (1988). *J. Histotechnol.*, **11**, 253.
37. Stolz W., Scharffetter K., Abmayr W., Koditz W., Krieg T. (1989). *Arch. Dermatol. Res.*, **281**, 336.
38. Syrjänen K. (1989). *APMIS*, **97**, 957.
39. Syrjänen S. (1990). *APMIS*, **98**, 95.
40. Herrington C. S., Burns J., Graham A. K., McGee J. O'D. (1990). *Histochem J.*, **22**, 545.
41. Guerin-Reverchon I., Chardonnet Y., Chignol M.-C., Thivolet J. (1990). *Histochemistry*, **93**, 637.
42. Wolber R. A., Lloyd R. V. (1988). *Hum. Pathol.*, **19**, 736.
43. Rasing L. A., Weger R. A., Verdonck L. E., van der Bij W. (1990). *APMIS*, **98**, 479.
44. Stickler J. G., Manivel C., Copenhagen C. M., Kubic V. L. (1990). *Hum. Pathol.*, **21**, 443.
45. Jones T. R., Parks C. L., Spector D. J., Hyman R. W. (1985). *Virology*, **144**, 384.
46. Syrjänen S., Laine P., Happonen R.-P., Niemelä M. (1989). *J. Oral Pathol. Med.*, **18**, 28.
47. Weiss L. M., Movahed L. A., Butler A. E., Swanson M. S. (1989). *Am. J. Surg. Pathol.*, **13**, 625.
48. Tay N., Chan S.-H., Ren E.-C. (1990). *J. Virol. Meth.*, **30**, 266.
49. Infatollno D., Prinarello A., Ceccato R., Barbazzza R. (1989). *Liver*, **9**, 360.
50. Harper M. E., Marselle L. M., Gallo R. C., Wong-Staal F. (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 772.
51. Richman D. D., McCutchan J. A., Spector S. A. (1987). *J. Infect. Dis.*, **156**, 823.
52. Boerman R. H., Arnoldus E. P. J., Raap A. K., Peters A. C. B., Ter Schegget J., Van der Ploeg M. (1989). *J. Clin. Pathol.*, **42**, 153.

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

*Антон Х. Н. Хопман, Пино Поддиге,
Олаф Мускер, Франс С. Рамакерс*

1. Введение

Для быстрого скрининга опухолей часто используют проточную цитометрию и морфометрический анализ опухолевых клеток или ядер, выделенных из парафинизированных блоков тканей, основываясь на том, что индекс ДНК в клетках некоторых опухолей отличается от обычного ([1, 2]; гл. 11). К сожалению, позволяя оценивать суммарное количество ДНК в достаточно большой популяции клеток, эти методы не дают никакой информации о специфических хромосомных нарушениях. Количественные и/или структурные хромосомные аномалии можно выявить кариотипированием опухолевых клеток [3—5]. Однако хромосомный анализ солидных опухолей с помощью обычных цитогенетических методов, как правило, проводят только после культивирования изолированных клеток, что не подходит для рутинных исследований. Кроме того, заключенный в парафин материал, полученный от онкологических больных с известным клиническим исходом, для такого цитогенетического анализа непригоден.

Для выявления количественных хромосомных аномалий в интерфазном ядре можно использовать так называемый метод интерфазной цитогенетики — гибридизацию *in situ* хромосомоспецифичных зондов с интерфазными ядрами [6]. Диагностика некоторых типов опухолей с помощью неизотопной гибридизации описана в работах [7—15] и в гл. 16. Здесь мы попытаемся дать критический анализ методов ГИС, которые можно использовать для анализа суспензий изолированных клеток солидных опухолей, а также парафиновых и криостатных срезов. Мы очертим область применения этих методов и рассмотрим предварительные данные по их применению для идентификации опухолей.

2. Методологические аспекты

Для рутинного обнаружения патологий можно использовать разбавленные суспензии изолированных клеток солидных опухолей, линии опухолевых клеток, отпечатки, цитологические пре-

параты, парафиновые и криостатные срезы солидных опухолей. В общем случае процедура ГИС состоит в следующем.

- а. Выбор зонда.
- б. Его мечение для проведения неизотопной гибридизации.
- в. Фиксация материала, приготовление препаратов, предварительная обработка.
- г. Гибридизация зонда с денатурированной ДНК-мишенью и отмывание препаратов после гибридизации.
- д. Иммуноцитохимическая детекция, интерпретация результатов.

2.1. ДНК-зонды

Для обнаружения количественных и структурных хромосомных aberrаций в опухолевых клетках можно использовать несколько типов ДНК-зондов. Обычно это ДНК, которые гибридизуются с высокоповторяющимися сегментами хромосом в основном из центромерных и теломерных районов [13, 16–21] (рис. 6.1): сателлитная или альфоидная ДНК. Последовательности-мишени для этих зондов представлены копиями от сотен до тысяч, т. е. содержат до нескольких тысяч т.п.н., локализованных в компактных околоцентромерных районах хромосом. Так, зонд, специфичный для хромосомы 1 (pUC 1.77), гибридизуется с tandemным повтором длиной 1,77 т.п.н., находящимся в околоцентромерном районе (1q12) [22]. Зонды, специфичные в отношении высокоповторяющихся сегментов ДНК, перечислены в табл. 6.1; некоторые из них имеются в продаже. Поскольку в интерфазных ядрах околоцентромерные районы хромосом выглядят как отдельные зоны гибридизации, число которых в S-фазе остается постоянным [94], эти зонды можно использовать для проведения относительно простой, дающей воспроизводимые результаты неизотопной гибридизации *in situ*. В протоколе 6.1 приведен состав гибридизационной смеси, позволяющий уменьшить неспецифическую гибридизацию. Если гибридизацию в присутствии 60% формамида и последующее отмывание проводить в жестких условиях (протокол 6.2), то высокоповторяющиеся последовательности будут гибридизоваться преимущественно со специфическими хромосомами.

Протокол 6.1. Гибридизационные смеси

Материалы

- Деионизованный формамид¹⁾
- 20 × SSC: 3,0 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH доведен до 7,0 с помощью 5 М HCl

- Буфер ТЭ: 10 мМ трис-НСI, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА
- Декстрансульфат (мол. масса > 200 000)
- Дрожжевая тРНК в ТЭ: 10 мг/мл
- ДНК спермы сельди в ТЭ: 10 мг/мл
- Модифицированные ДНК-зонды, меченные методом нуклеотидной инкорпорации или рассеянной затравки

Методика

1. Готовят 250 мкл следующей гибридизационной смеси.

Компонент	Объем	Конечная концентрация
20 × SSC	25 мкл	2 × SSC
Формамид	150 мкл	60%
Дрожжевая тРНК	5 мкл	0,2 мкг/мкл
ДНК спермы сельди	5 мкл	0,2 мкг/мкл
ДНК-зонд	x мкл	0,4–0,04 нг/мкл
Стерильная вода	до 250 мкл	

Хранят при –20 °С порциями по 50 мкл.

2. Готовят 10 мл гибридизационного буфера, добавив к 2 г декстрансульфата следующие компоненты.

Компонент	Объем	Конечная концентрация
20 × SSC	1 мл	2 × SSC
Формамид	6 мл	60%
Дрожжевая тРНК	200 мкл	0,2 мг/мл
ДНК спермы сельди	200 мкл	0,2 мг/мл

Растворяют декстрансульфат, нагревая смесь при 70 °С в течение 2 ч, и доводят объем стерильной водой до 10 мл. Разливают порциями по 1 мл и хранят при –20 °С.

3. Для приготовления гибридизационной смеси 1 объем гибридизационного раствора, содержащий меченый ДНК-зонд, смешивают с 1 объемом гибридизационного буфера, содержащего декстрансульфат, и центрифугируют при 10 000 g 1 мин²⁾.

¹⁾ Деионизованный формамид готовят, как это описано в гл. 4, и хранят порциями при –20 °С.

²⁾ Декстрансульфат использовать не обязательно, гибридизацию можно проводить в 60% формамиде, 2 × SSC. Однако декстрансульфат стабилизирует морфологию клеток и тканевых срезов и увеличивает эффективную концентрацию зонда (гл. 4). Для проведения гибридизации с двумя мишенями оба гибридизационных раствора перед добавлением гибридизационного буфера, содержащего декстрансульфат, смешивают (например, в равных объемах).

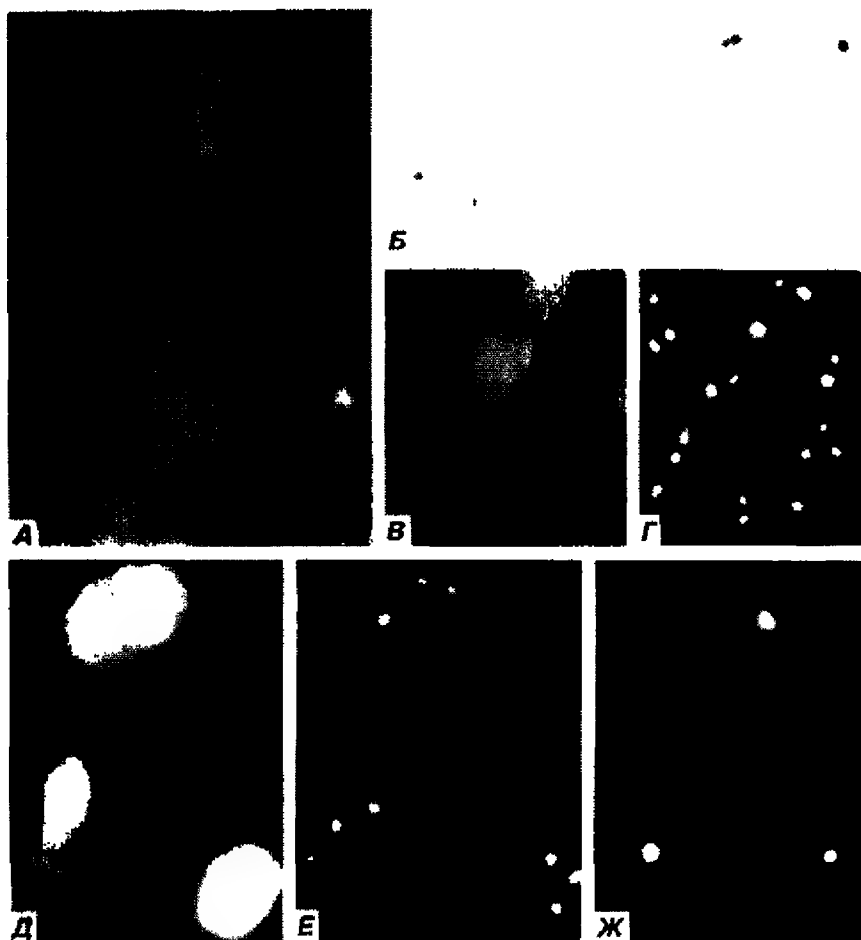


Рис. 6.1. Гибридизация *in situ* метафазных хромосом человека (А, Б), клеток мочевого пузыря линии Т24 (трисомия по хромосоме 1) (В, Г) и опухолевых клеток мочевого пузыря (по данным проточной цитометрии, диплоидия ТСС) (Д, Е, Ж) с биотинилированными зондами, специфичными к высокоповторяющейся области хромосомы 1 (А, Б, Г), к хромосоме 7 (Е), а также с меченным дигоксигенином зондом, специфичным к хромосоме 9 (Ж). А–Г — гибридизация *in situ* с одной мишенью, Д–Ж — с двумя. Обнаруживается несоответствие между числом хромосом 7 (трисомия) и 9 (моносомия). Биотинилированные зонды детектировали после гибридизации с ФИТЦ-конъюгированным авидином (А, Г, Е), пероксидаза-конъюгированным авидином (ДАБ/ H_2O_2) (Б) и моноклональными антителами к дигоксигенину и кроличьими антителами, конъюгированными с родамином, к белкам мыши (Ж). (В, Д — контрастирование ДАФИ.)

Таблица 6.1. Зонды, специфичные к высокоповторяющимся участкам хромосом¹⁾

Хромо- сома	Зонд	Размер встав- ки, т.п.н.	Тип ДНК	Источник данных
1	pUC 1.77	1,77	sat.III	Cooke, Hindley [22]
1	D1Z5		α -sat.	Willard et al. [18]
1p36	p1-79	0,90		Buroker et al. [24]
3	p α 3.5	2,10	Альфоидн.	Waye et al. [25]
6	p308	3,00	*	Jabs et al. [26]
7	p711	0,68	*	Waye et al. [27]
8	D8Z2	2,55	*	Donlon et al. [28]
9	pHUR98	0,16	sat.III	Moyzis et al. [29]
10	D10Z1	0,95	Альфоидн.	Devilee et al. [30]
11	pLC11A	0,85	*	Waye et al. [27]
12	p α 12H8	1,35	*	Looyenga et al. [31]
15	D15Z1	1,80	sat.III	Higgins et al. [32]
16	pHUR195	1,20	sat.II	Moyzis et al. [28]
17	p17H8	2,70	Альфоидн.	Waye et al. [33]
18	L1.84	0,68	*	Devilee et al. [34]
20	D20Z1		α -sat.	Werrick et al. [35]
22	D22Z3	0,38		Metzdorf et al. [36]
X	pBamX5	2,00	Альфоидн.	Willard et al. [37]
X	DXZ1		α -sat.	Waye et al. [27]
Y	DYZ1	3,40	sat.III	Lau et al. [38]
Y	DYZ3	5,5	Альфоидн.	Wolfe et al. [39]
Y	DYZ π	2,1	sat.II	Cooke et al. [40]

¹⁾ Некоторые из этих зондов можно приобрести у следующих фирм: Oncor, Molecular Cytogenetics, Gaithersburg, USA; American Type Culture Collection, Rockville, USA; Amersham, Buckinghamshire, UK.

2.2. Мечение зондов и их детекция

Зонды, использующиеся для локализации специфических нуклеотидных последовательностей в клетках с ненарушенной морфологией, на распластанных хромосомах или на тканевых срезах, можно пометить с помощью радиоактивных изотопов или неизотопными методами. Преимущество метода неизотопной гибридизации *in situ* (НГИС) состоит в том, что он обеспечивает достаточно высокое разрешение, практически безопасен, не требует много времени и относительно прост. Методы неизотопного мечения, описанные в гл. 4 и работах [41–45], основаны на присоединении к зонду молекулы-свидетеля и проведении иммуоцитохимического анализа после гибридизации зонда со специфической мишенью. Используют два подхода.

- а. Ферментативное включение в ДНК-зонд биотина, дигоксигенина, БУДР или флуоресцеина с помощью ник-трансляции или метода рассеянной заправки (гл. 4).
- б. Химическую модификацию зонда, заключающуюся во введении биотинового остатка, ацетиламинофлуореновой группы (ААФ) или ионов ртути. К последним после гибридизации присоединяют молекулы тиолгаптена и сульфонируют их [41—44].

Модифицированные зонды обычно выявляют иммуоцитохимическими методами, а биотинилированные — с помощью меченого авидина (стрептавидина) или моноклональных антител к биотину. Применяют следующие системы.

- а. Непрямые иммуоцитохимические методы с использованием антител к биотину или дигоксигенину и вторых антител, конъюгированных с флуорохромами, например с флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ), родамином или аминокметилкумаринуксусной кислотой (АМКУ).
- б. Непрямые иммуоцитохимические методы с использованием таких ферментов, как пероксидаза (с подходящими системами усиления) или щелочная фосфатаза, конъюгированные с антителами.
- в. Прямые цитохимические методы с использованием конъюгированного авидина или конъюгированных первых антител.
- г. Авидин/биотинилированные антитела к авидину [95].

В протоколе 6.2 описаны методы иммуоцитохимической детекции, наиболее удобные при ГИС на клеточных суспензиях и парафиновых срезах.

Протокол 6.2. Отмывание препаратов после гибридизации и иммуоцитохимическая детекция

А. Отмывание препаратов после гибридизации

Материалы

- Формамид
- Твин-20
- 20 × SSC (см. протокол 6.1)

Методика

1. Вынимают стекла из термостата и пинцетом снимают пленку резинового клея, скрепляющую вместе предметное и покровное стекла.

2. Промывают препараты при 42 °С в трех сменах буфера следующего состава: 60% формамид, 2 × SSC, pH 7,0, 0,05% твин-20, по 5 мин в каждой смене. Покровное стекло легко снимается уже в первой смене¹⁾.
3. Промывают препараты при 42 °С в двух сменах 2 × SSC, по 5 мин в каждой.

Б. Иммуноцитохимическая детекция: суспензии одиночных клеток (флуоресцентная метка)

Материалы

- Буфер А: 4 × SSC, 0,05% твин-20, pH 7,0
- 10 × ФСБ: 1,5 М NaCl, 0,1 М фосфат натрия, pH 7,2
- Обезжиренное сухое молоко
- ФИТЦ-конъюгированный авидин (Vector Laboratories)
- Биотинилированные козы антитела к авидину (Vector Laboratories)
- Реагент, предотвращающий выцветание, и контрастирующее вещество²⁾

*Методика*³⁾

1. Промывают препараты в буфере А в течение 5 мин при комнатной температуре.
2. Инкубируют препараты в 5% (в/о) обезжиренном сухом молоке, растворенном в буфере А, в течение 15 мин при 37 °С.
3. Инкубируют препараты с комплексом ФИТЦ–авидин, растворенным в буфере А (5 мкг/мл), в течение 20 мин при 37 °С.
4. Промывают препараты в трех сменах буфера А, по 5 мин в каждой.
5. Усиливают сигнал 20-минутной инкубацией препаратов при 37 °С с биотинилированными козыми антителами к авидину, разведенными буфером А в отношении 1:100. Промывают препараты в трех сменах буфера А, по 5 мин в каждой, и вновь инкубируют их в течение 20 мин при 37 °С с комплексом ФИТЦ–авидин (5 мкг/мл в буфере А).
6. Промывают препараты в двух сменах буфера А, по 5 мин в каждой, а затем 5 мин — в ФСБ.
7. Проводят препараты через серию спиртов, 70%, 90%, 100% этанол, по 3 мин в каждом, и высушивают их на воздухе.
8. Закljučают препараты в трис-НСI/глицерин, содержащий реагент, предотвращающий выцветание, и контрастирующее вещество²⁾.

Протокол 6.2 (Продолжение)

В. Иммуноцитохимическая детекция: парафиновые срезы (пероксидазная метка)

Материалы

- Буфер В: 1 × ФСБ, 0,05% твин-20
- Нормальная кроличья сыворотка (НКС)
- 3,3-диаминобензидинтетрагидрохлорид и пероксид водорода
- 0,1 М имидазол
- Гематоксилин (Merck)
- Среда для заключения препаратов (BDH, Poole, UK)
- Мышиные антитела к биотину (Dakoratts)
- Конъюгированные с пероксидазой кроличьи антитела к иммуноглобулину мыши (Dakoratts)

Методика

1. Промывают срезы в буфере В при комнатной температуре в течение 5 мин.
2. Инкубируют препараты в течение 15 мин при комнатной температуре с 2% НКС, растворенной в буфере В.
3. Инкубируют препараты в течение 45 мин при 37 °С с мышинными антителами к биотину, разведенными в буфере В в отношении 1:100.
4. Промывают препараты в трех сменах буфера В, по 5 мин в каждой.
5. Инкубируют препараты в течение 45 мин при 37 °С с меченными пероксидазой кроличьими антителами к иммуноглобулинам мыши, разведенными в буфере В в отношении 1:80. Промывают препараты в трех сменах буфера В, по 5 мин в каждой³⁾.
6. Инкубируют препараты в 0,05% ДАБ, 0,1 М имидазоле, 0,05% H_2O_2 , рН 7,6, в течение 5–10 мин в темноте.
7. Промывают препараты в трех сменах ФСБ, по 5 мин в каждой, контрастируют гематоксилином и заключают в среду.

¹⁾ В менее жестких условиях, например при 37 °С в 50% формамиде, 2 × SSC, избежать гибридизации с побочными сайтами связывания не удастся.

²⁾ Девять частей глицерина, содержащего 2,3% (в/о) 1,4-диазобисцикло-(2,2,2)-октана (ДАБЦО), растворяют при 70 °С в одной части 0,2 М трис-НСl, 0,02% NaN_3 , рН 8,0. Добавляют 4",6-диамино-2-фенилиндол (дающий синюю флуоресценцию ДНК, контрастирующую с красной флуоресценцией ФИТЦ или родамина) или пропидиумиодид (дающий красную флуоресценцию ДНК, контрастирующую с флуоресценцией ФИТЦ), в концентрации примерно 0,5 мкг/мл.

³⁾ При гибридизации с двумя мишенями, когда в качестве зондов используется ДНК, меченная биотином и дигоксигенином, реагенты для цитохимической детекции наслаивают в следующем порядке: а) моно- или поликлональные антитела к дигоксигенину (Boehringer Mannheim); б) конъюгированные вторые антитела к антидигоксигенину; в) конъюгированный авидин. Инкубации 2 и 3 можно проводить одновременно (в 4 × SSC) (см. также гл. 9).

2.3. Гибридизация *in situ* с несколькими мишенями

Используя зонды, меченные разными гаптенами, которые визуализируют с помощью разных аффинных систем, можно одновременно детектировать несколько мишеней в одной и той же клетке, распластанной хромосоме или на тканевом срезе (гл. 9; см. также [46–50]). Прекрасные результаты дает использование таких сочетаний, как флуоресцеинизотиоцианат (ФИТЦ) с родамином или с тexasским красным. С помощью ФИТЦ, родамина и АМК удастся выявлять одновременно три и даже четыре разных ДНК-зонда [47, 50]. Гибридизацию *in situ* с несколькими мишенями можно использовать также для обнаружения количественных и структурных хромосомных аномалий и для установления корреляций между ними [12, 13, 49, 51].

3. Методические аспекты гибридизации *in situ*

3.1. Фиксация и обработка препаратов

При подготовке препаратов для гибридизации *in situ* можно использовать некоторые стандартные фиксаторы тканей, такие, например, как метанол : уксусная кислота (3 : 1) (кариотипирование), 70% этанол (проточная цитометрия), метанол : ацетон (цитологические исследования), 4% формальдегид в ФСБ (гистологические исследования). Чтобы повысить проницаемость клеток для макромолекул (ДНК-зондов или антигенов), клетки обрабатывают протеолитическими ферментами. При этом также уменьшается фон, обусловленный аутофлуоресценцией, и увеличивается отношение сигнал/шум при детекции флуоресцентной метки. Следует помнить, однако, что в результате протеолиза изолированные клетки или части тканевых срезов могут утрачиваться, особенно если предметные стекла не обработаны адгезивами. Чтобы избежать этого, стекла покрывают поли-L-лизинном (гл. 7), желатиной (гл. 2) или силиконом [41, 42, 52, 53; гл. 4 и 5]. Иногда обрабатывают препараты 2,5% глутаральдегидом в ФСБ в течение 60 мин при комнатной температуре, затем споласкивают их в ФСБ и дистиллированной воде и высушивают на воздухе. Такую обработку следует проводить не более чем за несколько дней до гибридизации. Особенно эффективна она в случае парафиновых срезов (гл. 5).

3.2. Предварительная обработка препаратов солидных опухолей

3.2.1. Изолированные клетки

Разбавленные суспензии изолированных клеток (протокол 6.3) легко получить механической или ферментативной дезинтеграцией свежих препаратов солидных опухолей [54, 55], при этом разработаны специальные методики получения препаратов для последующего выявления хромосомных аномалий с помощью интерфазной цитогенетики [7, 10, 11, 49]. Прежде чем наносить клетки на предметные стекла, из них удаляют плазматические и ядерные белки с помощью спирта / уксусной кислоты, а после нанесения для повышения проницаемости проводят мягкий протеолиз [56] (рис. 6.1, Д–Ж). Такая процедура фиксации аналогична используемой в проточной цитометрии (гл. 11). Клеточные суспензии, фиксированные этанолом, можно хранить годами без какого-либо ухудшения результатов гибридизации, проводимой в соответствии с протоколом 6.3. Для повышения специфичности гибридизации и усиления гибридизационного сигнала концентрацию пепсина и продолжительность протеолиза следует подбирать опытным путем. Число хромосомных копий легко недооценить, когда обработка пепсином недостаточна; излишний же протеолиз может приводить к вариабельности числа хромосомных копий вследствие нарушения морфологии [20]. Препараты некоторых опухолей (в частности, мочевого пузыря и почек) можно обрабатывать стандартным способом: 20-минутным протеолизом пепсином в концентрации 100 мкг/мл в 0,01 н. NaCl. Если в результате протеолиза морфология клеток и тканей очень сильно нарушается, гибридизация не дает однозначных результатов, и в протокол приходится включать дополнительные процедуры (прогревание предметных стекол, фиксацию), восстанавливающие морфологию. Такой подход используется, например, при получении цитологических препаратов, отпечатков или препаратов изолированных клеток ворсинок хориона в случае пренатальной диагностики.

Протокол 6.3. Гибридизация *in situ*: линии опухолевых клеток и разбавленные клеточные суспензии, полученные из свежих опухолей

А. Получение и фиксация разбавленных клеточных суспензий

Материалы

- Найлоновый фильтр с диаметром пор 100 мкм
- 70% этанол (–20 °C)

Методика

1. Гомогенизируют кусочки ткани, растирая их в чашке Петри, и готовят разбавленную суспензию изолированных клеток. Фильтруют суспензию через нейлоновый фильтр.
2. Фиксируют профильтрованную клеточную суспензию или линию опухолевых клеток в 70% этаноле (-20°C). Этот материал можно хранить при -20°C от нескольких месяцев до нескольких лет без ухудшения результатов гибридизации¹⁾.

Б. Гибридизация *in situ*

Материалы

- Предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном или силиконированные
- Пепсин из слизистой желудка поросенка (2500–3500 ЕД на 1 мг белка)
- 0,01 М HCl
- 1% формальдегид в ФСБ
- 70%, 95%, 100% этанол
- Резиновый клей

Методика

1. Готовят клеточную суспензию с плотностью около $5 \cdot 10^5$ клеток/мл и раскапывают ее на предметные стекла аликвотами по 5–10 мкл²⁾.
2. Высушивают препараты на воздухе в течение 15 мин³⁾.
3. Инкубируют препараты с пепсином в концентрации 50–400 мкг/мл в 0,01 М HCl в течение 20 мин при 37°C . Оптимальную концентрацию фермента следует подбирать опытным путем⁴⁾.
4. Промывают препараты в пяти сменах воды и пяти сменах ФСБ (в глубоких стаканах).
5. Дополнительно фиксируют клетки в 1% формальдегиде, приготовленном в ФСБ, в течение 10 мин при комнатной температуре.
6. Промывают препараты в пяти сменах ФСБ, затем в пяти сменах воды (в глубоких стаканах).
7. Дегидратируют препараты в трех сменах этанола (70, 90 и 100%), по 3 мин в каждой⁵⁾, затем высушивают их на воздухе³⁾.
8. Наносят на каждый препарат 5–10 мкл гибридизационной смеси, содержащей 1–3 нг зонда, накрывают покровными стеклами и промазывают стекла по периметру резиновым клеем (последнее необязательно).

Протокол 6.3 (Продолжение)

9. Денатурируют 2–4 мин при 60–80 °С⁶⁾.

10. Гибридизуют во влажной камере в течение ночи при 37 °С⁷⁾.

¹⁾ Суспензии можно фиксировать при 4 °С в метаноле : уксусной кислоте (3:1) или этаноле : уксусной кислоте (3:1) и хранить при –20 °С (гл. 9). Оставшуюся в клетках цитоплазму можно удалить, а проницаемость клеток повысить, погрузив стекла на 10–60 с в 70% уксусную кислоту или на 15 мин в смесь 0,1 М HCl, 0,05% тритон X-100 или твин-20.

²⁾ Концентрация суспензии может варьировать в зависимости от размеров образца ткани и плотности клеток, которую хотят иметь на предметном стекле.

³⁾ Для лучшего прилипания клеток прогревают стекла в течение 1 ч при 80 °С.

⁴⁾ Стандартная концентрация — 100 мкг/мл. Для мягкой обработки достаточно погрузить препараты на 15 мин в смесь 0,1 М HCl, 0,05% тритон X-100 или твин-20.

⁵⁾ После фиксации, до нанесения зонда под покровное стекло, можно промыть препараты в 2 × SSC.

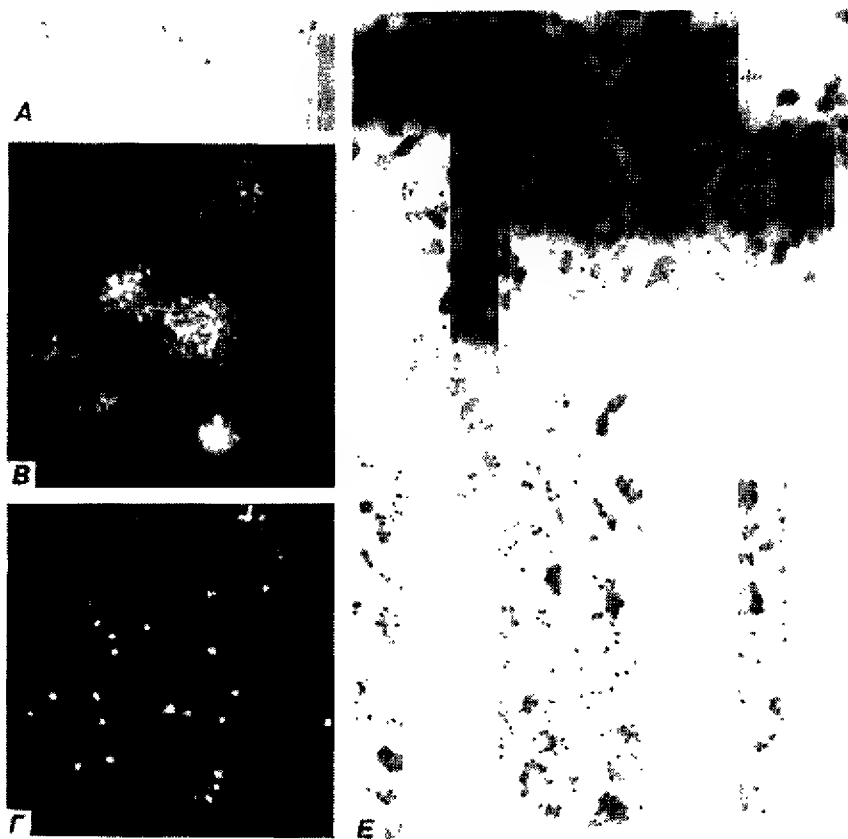
⁶⁾ Стандартные условия денатурации: 3 мин при 70 °С.

⁷⁾ Для обнаружения околоцентромерных высокоповторяющихся последовательностей достаточно гибридизации в течение 2 ч.

3.2.2. Парафинизированные препараты опухолевых тканей (протокол 6.4)

Число работ, в которых метод ГИС применялся бы для выявления хромосомных aberrаций в ядрах приготовленных рутинным способом препаратов, заключенных в парафин, весьма невелико. В первых таких работах парафинизированные препараты применялись для определения пола, при этом зондом служила Y-специфичная ДНК [57–60]. Позже методом ГИС была обнаружена трисомия по хромосоме 1 в клетках опухоли семен-

Рис. 6.2. Результаты гибридизации *in situ* срезов переходно-клеточных карцином с биотинилированным зондом, специфичным к высокоповторяющимся последовательностям ДНК хромосомы 1. А — нормальные клетки (дисомия по хромосоме 1); Б — атипичные клетки (трисомия по хромосоме 1); Г, Е — анеуплоидные опухолевые клетки с большим числом копий хромосомы 1, выявленные с помощью проточной цитометрии. В, Г — флуоресцентная гибридизация *in situ* опухолевых клеток, выделенных из свежей опухоли до ее заключения в парафин (та же опухоль, что и на рис. Д). Биотинилированный зонд детектировали после гибридизации с моноклональными антителами к биотину, с конъюгированными с пероксидазой кроличьими антителами к белкам мыши (А, Б, Г, Е), а также с ФИТЦ-конъюгированным авидином (Д). [Контрастирование гематоксилином Майера (А, Б, Г, Е) и ДАФИ (В).]



ников [61, 62]. Недавно мы сравнили число сайтов гибридизации в фиксированных этанолом препаратах разбавленных клеточных суспензий, приготовленных из опухолей мочевого пузыря, с результатами, полученными на парафиновых срезах этих же опухолей [63] (рис. 6.2). Наилучшая корреляция наблюдалась для диплоидных переходно-клеточных карцином и низкоккачественных опухолей. В случае анеуплоидных опухолей число сайтов гибридизации на парафиновых срезах было ниже реального числа хромосомных копий (рис. 6.2, В—Д), в основном потому, что анеуплоидные ядра обычно крупнее диплоидных. Перечислим те преимущества, которые дает гибридизация *in situ* в случае парафиновых срезов по сравнению с изолированными опухолевыми клетками.

- а. На срезах можно определить опухолевые клетки, несущие хромосомные aberrации, и провести корреляцию с гистологической картиной.
- б. При получении срезов не происходит отбора клеток, как при выделении их из опухоли.
- в. Гибридизация на срезах позволяет выявить гетерогенность опухоли, а также тетраплоидные клетки.
- г. Можно проводить ретроспективные исследования, используя архивный материал.

Однако применение этого метода в повседневной практике ограничивается тем, что для каждого парафинового блока необходимо подбирать свой режим протеолиза. Успех гибридизации *in situ* во многом определяется доступностью мишени для зонда, и чтобы повысить проницаемость среза для зондов и антител, обычно проводят протеолитическую обработку пепсином или протеиназой К. Для повышения эффективности гибридизации принимают также следующие меры [57–62].

- а. Удаление парафина с помощью подогретого ксилола.
- б. Замораживание и оттаивание клеток.
- в. Увеличение времени протеолиза.
- г. Повышение температуры денатурации.
- д. Обработка препарата HCl до протеолиза.

Данные о воспроизводимости результатов, полученных на большом числе серийных срезов парафиновых блоков, отсутствуют. Чтобы повысить эффективность гибридизации *in situ* с использованием обработки пепсином в 0,2 н. HCl для повышения проницаемости срезов, можно провести диссоциацию комплекса

ДНК—гистоны или прогреть препараты в горячем (80 °С) 1 М тиоцианате натрия. Подобная предварительная обработка значительно повышает результативность протеолиза, что проявляется в улучшении воспроизводимости и эффективности гибридизации *in situ*. В протоколе 6.4 описана процедура гибридизации на приготовленных обычным способом парафиновых срезах различных опухолей: опухоли мочевого пузыря, мезотелиомы, карциномы яичников, хорионаденомы, лимфомы и др. Время протеолиза в каждом случае следует подбирать индивидуально, варьируя его от 5 мин до 1 ч. Обработка тиоцианатом натрия необязательна и может понадобиться, если в стандартных условиях гибридизация отсутствует. Условия гибридизации зависят от исследуемого типа клеток, поскольку разные клетки (опухолевые, клетки стромы или экссудата в месте воспаления) перед гибридизацией обрабатываются по-разному. Методика, описанная в протоколе 6.4, позволяет получать положительные результаты в 90% случаев.

Протокол 6.4. Гибридизация *in situ* на парафиновых срезах

Материалы

- Предметные стекла, покрытые поли-L-лизинном и активированные глутаральдегидом
- Пепсин из слизистой желудка поросенка (2500—3500 ЕД на 1 мг белка)
- 0,2 М HCl
- 1% H₂O₂ в метаноле
- Ксилол
- Метанол
- 1 М тиоцианат натрия (NaSCN)

Методика

1. Готовят парафиновые срезы толщиной 4—6 мкм.
2. Помещают срезы на капли дистиллированной воды при 40 °С, нанесенные на предметные стекла¹⁾.
3. Высушивают срезы и оставляют предметные стекла при 56 °С на ночь.
4. Удаляют парафин в трех сменах 100% ксилола в течение 10 мин, затем в двух сменах 100% метанола, по 5 мин в каждой смене.
5. Погружают стекла на 30 мин в 1% H₂O₂ в 100% метаноле.
6. Промывают препараты в двух сменах метанола, по 5 мин в каждой, и высушивают на воздухе.

Протокол 6.4 (Продолжение)

7. Чтобы повысить эффективность протеолиза, погружают препараты в 1 М NaSCN при 80 °C на 10 мин²⁾.
8. Промывают препараты в двух сменах воды, по 5 мин в каждой.
9. В течение 5–60 мин инкубируют препараты при 37 °C в растворе, содержащем пепсин в количестве 4 мг на 1 мл 0,2 М HCl³⁾.
10. Промывают стекла в пяти сменах воды, затем в пяти сменах ФСБ (в глубоких стаканах).
11. Дегидратируют срезы в 70%, 90% и 100% этаноле, по 3 мин в каждом, затем высушивают на воздухе⁴⁾.
12. Наносят на препарат 10–15 мкл гибридизационной смеси, накрывают покровным стеклом и промазывают стекла по периметру резиновым клеем (см. протокол 6.3).
13. Денатурируют зонды и мишени при 80 °C в течение 4–10 мин⁵⁾.
14. Проводят гибридизацию во влажной камере в течение ночи при 37 °C.

¹⁾ Для лучшего прилипания срезов можно использовать силиконированные стекла (гл. 4 и 5). Оставшиеся после закрепления срезов на стекле активные альдегидные группы блокируют 1% гидроксилхлоридом аммония или 2% БСА в ФСБ при 37 °C в течение 1 ч.

²⁾ Оптимальные условия обработки препаратов для разных случаев различаются. Их можно подобрать, используя четыре среза. Два из них сначала обрабатывают тиоцианатом натрия, а затем — пепсином в течение 5 и 15 мин. Два других сразу обрабатывают пепсином, но в течение 15 и 30 мин. Анализируя полученные результаты (см. табл. 6.3), определяют подходящие условия. Например, если обнаруживается, что в результате протеолиза полностью утрачивается морфология, уменьшают его продолжительность. Напротив, при недостаточном протеолизе (после обработки тиоцианатом натрия) время обработки увеличивают. Альтернативный способ повышения эффективности протеолиза состоит в погружении препаратов на 20 мин в 0,2 М HCl при комнатной температуре или их многократном замораживании и оттаивании.

³⁾ Как правило, время инкубации составляет 30 мин. Для протеолиза можно использовать также протеиназу К и проназу.

⁴⁾ Для улучшения прилипания срезов предметные стекла можно прогреть в течение 30 мин при 80 °C.

⁵⁾ Обычно денатурацию проводят прогреванием препарата при 80 °C в течение 8 мин. В случае денатурации при 90 °C часто происходит утрата материала и/или изменение морфологии ядер.

3.2.3. Замороженные срезы (см. протокол 6.5)

Никакой детальной методики выявления количественных или структурных хромосомных aberrаций в солидных опухолях не опубликовано. Вообще говоря, замороженные срезы можно фиксировать в метаноле/ацетоне или в более сильном фиксаторе —

формальдегиде. Протеолиз не должен быть слишком сильным, чтобы не произошла полная утрата морфологии. В протоколе 6.5 дана примерная методика гибридизации *in situ* на замороженных срезах, исходя из которой можно подобрать оптимальные условия процедуры.

Протокол 6.5. Гибридизация *in situ* на замороженных срезах

Материалы

- Предметные стекла, покрытые поли-L-лизином или органосиланом
- Пепсин из слизистой желудка поросенка (2500—3500 ЕД на 1 мг белка)
- 0,01 М HCl
- Метанол : ацетон (1 : 1) при -20°C
- 1% формальдегид в ФСБ

Методика

1. Монтируют замороженные срезы толщиной 4—6 мкм на предметных стеклах, покрытых поли-L-лизином или органосиланом¹⁾.
2. Оставляют на ночь при комнатной температуре.
3. Фиксируют срезы в смеси метанол : ацетон (1:1) при -20°C в течение 20 мин²⁾.
4. Промывают препараты в двух сменах ФСБ, 0,5% твин-20, по 5 мин в каждой.
5. Инкубируют препараты с пепсином (50—400 мкг на 1 мл 0,01 М HCl) в течение 10 мин при 37°C . Оптимальные условия протеолиза подбирают опытным путем³⁾.
6. Промывают стекла в пяти сменах воды и в пяти сменах ФСБ, налитых в глубокие стаканы.
7. Фиксируют срезы 1% формалином в ФСБ в течение 10 мин при комнатной температуре.
8. Промывают препараты в пяти сменах ФСБ, затем в пяти сменах воды, налитых в глубокие стаканы.
9. Дегидратируют срезы в трех сменах этанола, 70%, 90% и 100%, по 3 мин в каждой, затем высушивают на воздухе⁴⁾.
10. Наносят на срезы по 5—10 мкл гибридизационной смеси, содержащей 1—3 нг ДНК-зонда, накрывают покровными стеклами и промазывают стекла по краям резиновым клеем.

Протокол 6.5 (Продолжение)

11. Проводят денатурацию при 70–80 °C в течение 2–4 мин⁵⁾.

12. Оставляют для гибридизации во влажной камере при 37 °C на ночь⁶⁾.

¹⁾ Для лучшего прилипания срезов стекла можно активировать глутаральдегидом.

²⁾ Если во время гибридизации морфология препарата очень сильно искажается, можно провести фиксацию 1% формалином в ФСБ в течение 10 мин при комнатной температуре.

³⁾ Чтобы немного повысить проницаемость срезов, препараты можно погрузить на 15 мин в смесь 0,1 М HCl, 0,05% тритон X-100 (или твин-20).

⁴⁾ Для лучшего сцепления срезов со стеклом предметные стекла можно предварительно прогреть при 80 °C в течение 30–60 мин.

⁵⁾ Обычно денатурацию проводят прогреванием препарата при 70 °C в течение 3 мин. Зонд и мишень можно денатурировать по отдельности. Мишень денатурируют, погрузив препараты на 3 мин в смесь 70% формамида и 2 × SSC, а затем проводя их через батарею спиртов при 4 °C.

⁶⁾ Для выявления высококопьющихся последовательностей в около-центромерных областях хромосом достаточно двухчасовой гибридизации.

3.3. Определение числа гибридизационных сигналов и интерпретация результатов

3.3.1. Суспензии изолированных клеток

Для определения числа сигналов просматривают примерно 200 ядер. Предполагается, что число сигналов, полученных при гибридизации со специфичными к центромерной ДНК зондами, равно числу хромосомных копий (плоидности). В табл. 6.2 суммированы причины, по которым это соответствие может нарушаться. Доля клеток, не дающих гибридизационного сигнала, в разных экспериментах неодинакова; как правило, такая артефактная «нуль-сомия» составляет 10%. Однако при оптимальной предварительной обработке препаратов (оптимальном протеолизе и отсутствии фона, маскирующего ядра) эта величина может составлять всего 3%. Если при выявлении анеуплоидных и тетраплоидных клеток в опухолевых тканях (в первую очередь методом проточной цитометрии) получен высокий процент (>15%) ядер, не дающих гибридизационного сигнала, это неизбежно приводит к занижению числа хромосомных копий или гетерогенности опухоли. Доля ядер с одним гибридизационным сигналом для диплоидных клеток варьирует от 5 до 20% в зависимости от процедуры гибридизации. Всегда есть ядра, в которых флуоресцентные пятна располагаются так близко друг к другу, что выглядят как одно. Если число клеток с одним сигналом на ядро в клеточной популя-

Таблица 6.2. Причины неправильной оценки числа хромосомных копий методом гибридизации *in situ* в случае разбавленных суспензий опухолевых клеток

Наблюдаемая картина	Характер ошибки/Пути исправления
Высокий процент клеток, не дающих гибридизационного сигнала	Занижение числа хромосомных копий. Оптимизируйте протеолиз (увеличьте концентрацию фермента и время протеолиза)
Наложение ядер	Завышение числа копий. Ресуспендируйте клетки с помощью микропипетки; обработайте клетки протеолитическим ферментом до нанесения суспензии на стекла
Сильная фоновая флуоресценция, маскирующая часть ядер	Занижение числа хромосомных копий. Оптимизируйте протеолиз, чтобы удалить из клеток цитоплазму
Разные по величине гибридизационные сигналы в одной и той же клетке	Занижение числа копий. Оптимизируйте протеолиз, чтобы исключить полиморфизм, проведите гибридизацию с нормальными лимфоцитами
Слабые сигналы	Завышение числа копий. Проводите гибридизацию в более жестких условиях (более высокая концентрация формамида и более высокая температура)
Попарное расположение гибридизационных сигналов (спаренные ядра)	Завышение числа копий. Число сигналов в спаренных ядрах считайте равным одному хромосомному набору
Утрата морфологии ядер	Занижение числа копий. Оптимизируйте протеолиз (увеличьте концентрацию фермента и время обработки); используйте стекла, покрытые поли-L-лизинном; проверьте, сухие ли препараты (лучше всего прогреть их при 80 °C); оптимизируйте процедуры после фиксации

ции превышает 20%, то есть веские основания считать их моносомными по определенной хромосоме; впрочем, при гибридизации с двумя мишенями этот произвольно взятый минимальный процент может уменьшиться до 10%. Если доля полиплоидных клеток превышает 5% от общего числа клеток (произвольно), то можно думать о трисомии или тетрасомии опухоли. В этом случае из подсчета должны быть исключены перекрывающиеся ядра, а также слабые и двойные гибридизационные сигналы. Перечислим типичные проблемы, которые возникают при интерпретации результатов гибридизации *in situ* в случае анеуплоидных клеток.

- а. Спаривание хромосом может приводить к тому, что вместо двух сигналов будет наблюдаться один, как при моносомии. Заметим, что соматическая конъюгация хромосом 1 и 17 обнаружена, например, в нормальных тканях головного мозга [64, 65].
- б. Нередко происходят транслокации части короткого плеча хромосомы 15 на другие хромосомы D-группы. В таком случае при гибридизации *in situ* зонда, специфичного для хромосомы 15, в интерфазных ядрах проявляются три сигнала, и делается вывод о трисомии по хромосоме 15 [66, 67].
- в. Хромосомный полиморфизм, например по хромосомам 1 и 9, приводит к варибельности интенсивности гибридизационного сигнала при гибридизации с хромосомоспецифичными последовательностями сателлитной ДНК [68, 69]. Учет слабых сигналов, отвечающих, например, минорным сайтам связывания, может привести к неверной оценке числа хромосомных копий.

Для более точной интерпретации результатов следует руководствоваться следующими правилами.

- а. Не учитывать перекрывающиеся ядра.
- б. Если нет никаких указаний на делеции или хромосомный полиморфизм, то следует учитывать только ядра с более или менее одинаковыми по интенсивности флуоресценции гибридизационными сигналами.
- в. Не принимать во внимание слабые гибридизационные сигналы.
- г. Учитывать только четкие, дискретные флуоресцирующие пятна или полосы в ядрах.

3.3.2. Парафиновые срезы

При интерпретации результатов гибридизации на парафиновых и замороженных срезах в принципе используются те же критерии, что и для суспензий изолированных клеток. Однако в случае парафиновых срезов доля нормальных клеток, вообще не дающих сигнала или дающих один сигнал, выше (примерно 25%), чем в случае суспензий (примерно 5%), что требует более тщательного анализа результатов (выбор подходящей части опухоли, нормальной ткани или клеток стромы), поскольку никаких простых критериев «отбраковки» ядер нет. Размер ядер клеток «диплоидных» опухолей, определяемый методом проточной цитометрии, лежит в диапазоне 4–6 мкм. В этом случае зависимость

Таблица 6.3. Причины неправильной интерпретации результатов гибридизации *in situ* на парафиновых срезах с использованием пероксидазы

Наблюдаемая картина ¹⁾	Характер ошибки/Пути исправления
Высокий процент клеток, не дающих гибридизационного сигнала или дающих один сигнал	Занижение числа копий. Увеличьте время протеолиза до 60 мин, используя свежий пепсин каждые 15 мин
Утрата морфологии при наличии сигналов	Возможно как завышение, так и занижение числа копий. Увеличьте время протеолиза; используйте разные покрытия для стекол; понизьте температуру денатурации
Хорошая морфология ядер, отсутствие гибридизации	Увеличьте время протеолиза; используйте различные ферменты (протеиназу К вместо пепсина); до протеолиза обработайте препараты тиоцианатом или кислотой; повысьте температуру денатурации до 90 °C
Плохая морфология ядер, отсутствие гибридизации	Используйте другое покрытие для стекол; для лучшего удаления белков и уменьшения времени протеолиза вначале обработайте препараты тиоцианатом или кислотой
Наложение ядер	Используйте более тонкие срезы, помня, однако, что это может привести к занижению числа копий; после протеолиза для улучшения морфологии фиксируйте клетки в формальдегиде или прогрейте срезы при 80 °C
Разное число хромосомных копий для разных зондов	Проводите гибридизацию на серийных срезах одинаковой толщины, полученных с одной и той же области опухоли; по возможности проведите гибридизацию с двумя мишенями на свежely выделенных клетках этой же опухоли

¹⁾ Оптимальное время предгибризационной обработки для разных случаев различно. Стандартный режим протеолиза для срезов толщиной 6 мкм: 30 мин. 37 °C, пепсин в количестве 4 мг на 1 мл 0,2 М HCl; денатурация: 8 мин при 80 °C.

числа поддающихся детекции ядер от реальной копийности хромосом, обусловленная «отбраковкой», невелика. Истинное число хромосомных копий можно установить почти в 50% ядер, так что случаи моносомии и трисомии не вызывают сомнений. Размер ядер в анеуплоидных и тетраплоидных опухолях колеблется от 6 до 13 мкм (в зависимости от содержания ДНК), и число хромосомных копий может быть занижено. С ростом размера ядер степень этой недооценки будет увеличиваться. Истинное число хромосомных копий можно все же оценить, если считать, что оно равно максимальному числу гибридизационных сигналов на ядро.

Проводя гибридизацию на серийных срезах (при этом в одном эксперименте должны использоваться срезы одинаковой толщины, прошедшие одинаковую протеолитическую обработку) с разными по специфичности зондами, можно оценить несоответствие между числом разных хромосом. В табл. 6.3 рассмотрены причины некорректности интерпретации результатов гибридизации на парафиновых срезах и возможные пути их устранения. Во всех случаях решение состоит в поисках компромисса между сохранением морфологии препарата и повышением интенсивности гибридизационного сигнала. Прекрасные результаты дает разная по продолжительности ферментативная обработка парафиновых срезов. Длительный протеолиз обычно приводит к увеличению числа гибридизационных сигналов на фоне «размывания» ядер. Альтернативный подход к оценке числа хромосомных копий методом ГИС на парафиновых [70] и криостатных срезах основан на выделении ядер из толстых срезов. Число «отбракованных» ядер в этом случае оказывается меньше, чем при прямой гибридизации на срезах.

4. Практическое применение

Описанные выше методы гибридизации *in situ* применялись для идентификации разных видов злокачественных новообразований: лейкоза [12, 13, 15, 71–77], рака молочной железы [8] и женских половых органов [47], опухолей мозга [9, 10, 78, 79], рака предстательной железы [17], яичек [14, 61, 62], желудка [11], мочевого пузыря [7, 49, 56, 63, 80, 96, 97]. Однако использование данных интерфазной цитогенетики для выявления хромосомных aberrаций затруднительно, поскольку получаемые в этом случае гибридизационные сигналы не позволяют обнаружить сложные структурные перестройки. С помощью используемых в интерфазной цитогенетике зондов можно исследовать только околоцентромерные области хромосом. Для идентификации таких структурных перестроек, как транслокация и делеция длинных и коротких плеч или их частей, необходимо дифференциальное окрашивание целых хромосом.

4.1. Интерфазная цитогенетика и кариотипирование

Методы дифференциального окрашивания хромосом широко используются для выявления различных генетических аномалий (например при лейкозах), а также в диагностических и прогностических целях, когда соответствующие хромосомные aberrации хорошо известны. В работах [12, 13, 74, 81] сравниваются неизотопные методы интерфазной цитогенетики с классическими

цитогенетическими методами анализа клеточных линий, полученных из солидных опухолей, опухолевых клеток костного мозга и периферической крови. Несмотря на то что круг выявляемых нарушений ограничивается тем, что используются зонды, специфичные только для околоцентромерных областей, гибридизация с двумя мишенями в интерфазных ядрах позволяет обнаружить также межхромосомные транслокации [12, 13]. В некоторых случаях это удастся сделать только ретроспективно, хотя недавно методом гибридизации с двумя мишенями были идентифицированы маркерные хромосомы. В этом случае ГИС-данные использовались для установления природы таких хромосом. С помощью ГИС удастся также обнаружить очень небольшое число клеток реципиента в трансплантатах костного мозга, полученных от лиц другого пола [71, 73, 75]. В этих случаях мужские клетки, составляющие в популяции женских клеток всего 0,01%, можно было выявить с помощью Y-специфичного зонда [75].

В отсутствие кариотипических данных результаты обычных цитогенетических исследований солидных опухолей могут послужить стимулом к скринингу интерфазных клеток [4, 5]. Показано, что при раке мочевого пузыря имеет место моносомия по хромосоме 9 и трисомия по хромосомам 1 и 7. Исследование с помощью интерфазной цитогенетики переходно-клеточных карцином (низкозлокачественных опухолей), обнаруженных методом проточной цитометрии, показало, что примерно у 60% из них наблюдаются количественные aberrации, затрагивающие по крайней мере одну из хромосом 1, 7 и 9 [49, 80, 96].

Самое удивительное, что около 30% таких карцином оказались моносомными по хромосоме 9. Примерно у 30 и 20% обнаружена трисомия по хромосомам 1 и 7 соответственно [49]. У высокозлокачественных опухолей и/или у опухолей, которые по результатам проточной цитометрии были анеуплоидными/тетраплоидными, по хромосоме 9 часто наблюдается дисомия, в то время как другие хромосомы находятся в тетраплоидном состоянии.

Многочисленные количественные хромосомные aberrации, например полисомия по хромосоме 7 и утрата хромосом 10 и 22, а также половых хромосом, были выявлены при цитогенетических исследованиях опухолей головного мозга. В двух клеточных линиях глиомы с помощью гибридизации *in situ* была обнаружена утрата хромосомы 22 и полисомия по хромосоме 7. Скрининг этих aberrаций с помощью гибридизации зондов, специфичных к центромерной ДНК, с интерфазными ядрами выявил такие же хромосомные аномалии, но с другой, чем описано в литературе, частотой [78, 79].

4.2. Интерфазная цитогенетика и проточная цитометрия

Важно иметь в виду, что число гибридизационных сигналов для данного зонда, специфичного к центромерной области ДНК, на разных стадиях клеточного цикла, включая G0/G1, S и G2/M, постоянно. Это позволяет отличить популяцию G2/M-клеток «диплоидной» опухоли, выявленной методом проточной цитометрии, от популяции G0/G1-клеток «тетраплоидной» опухоли. В первом случае на каждую хромосому приходится два гибридизационных сигнала, во втором — четыре [94].

4.2.1. Рак мочевого пузыря

Результаты гибридизации *in situ* с опухолевыми клетками мочевого пузыря, для которых индекс ДНК, по данным проточной цитометрии, составляет 1,0, показали, что плоидность клеток «диплоидных» переходно-клеточных карцином часто отличается от нормальной [7]. Так, в них нередко обнаруживаются тетраплоидные клетки (<5%), совершенно не выявляемые при проточной цитометрии. Анализ тетраплоидных/анеуплоидных переходно-клеточных карцином обнаруживает еще более отчетливую хромосомную гетерогенность клеточной популяции как в пределах одной опухоли, так и при сравнении разных опухолей с одинаковым индексом ДНК [56]. В этих случаях хромосома 9 встречалась в клетках реже, чем хромосомы 1, 7 и 11 [49]. В принципе с ростом опухоли индекс ДНК увеличивался. Высокая вариабельность числа хромосомных копий в клетках переходно-клеточных карцином затрудняет сравнение индексов ДНК, плоидностей и данных кариотипирования.

4.2.2. Рак молочной железы

В работе [8] сообщается об обнаружении количественных aberrаций хромосомы 1 и/или хромосомы 18 в семи первичных опухолях молочных желез. Несмотря на то что при проточной цитометрии во всех случаях на ДНК-гистограмме присутствует единственный пик и его положение отвечает нормальному содержанию ДНК, судя по результатам гибридизации с интерфазными ядрами, шесть из исследованных опухолей были гетерогенными.

4.2.3. Опухоли яичек

Ранняя диагностика опухолей яичек, т. е. диагностика на стадии карциномы *in situ* (CIS), очень важна для успешного лечения этой патологии. Так называемые атипичные половые клетки по морфологии напоминают злокачественные клетки семиномы. По

данным проточной цитометрии, еще одной особенностью последних, помимо количественных аномалий по хромосоме 1, является гипердиплоидия. В работе [14] описана неинвазивная процедура скрининга карциномы яичек *in situ* методом гибридизации интерфазных ядер спермы с зондом, специфичным по отношению к хромосоме 1. Производился подсчет доли гипердиплоидных клеток в сперме больных с локальной (изолированной) CIS и больных с CIS, сопровождающейся образованием опухоли. Для выявления в сперме анеуплоидных клеток ГИС, по-видимому, предпочтительнее проточной цитометрии вследствие более высокой чувствительности.

4.2.4. Опухоли желудка

Проведя гибридизацию *in situ* на препаратах ядер, выделенных из клеток десяти умеренно или слабо дифференцированных аденокарцином желудка, Ван Деккен и др. [11] обнаружили количественные aberrации по хромосомам 1, 7, 17, X и Y. Помимо изменения ploидности, зарегистрированного с помощью проточной цитометрии, при гибридизации была выявлена хромосомная анеуплоидия. Кроме того, в большом числе клеток шести из восьми опухолей, полученных от больных мужчин, отсутствовала Y-хромосома, при этом у двух других опухолей доля таких клеток была невелика.

4.2.5. Пузырный занос и водянка плода

Дифференциальная диагностика полного (ППЗ) и частичного (ЧПЗ) пузырного заноса, а также водянки плода, основанная только на гистологических данных, весьма затруднительна. В работе [82] была сделана попытка различить материнские клетки и клетки трофобласта методом гибридизации зондов, специфичных для хромосом 1, X и Y, на соответствующих парафиновых срезах. Это позволило бы установить, диплоидны или триплоидны ПЗ-клетки, что существенно для дифференциальной диагностики ППЗ и ЧПЗ. Как следствие разграничения материнских клеток и трофобластных ППЗ-клеток была обнаружена цитогенетическая гетерогенность пролиферирующего цитотрофобласта, что подтверждало данные об относительно высоком проценте гиперплоидных клеток, полученные методом проточной цитометрии.

4.3. Определение гетерогенности опухолей

Считается, что тетраплоидизация — критический процесс в развитии многих солидных опухолей, при котором случайная или

неслучайная утрата хромосом может привести к отбору и размножению анеуплоидных клеток. Это наводит на мысль, что в таких опухолях присутствуют популяции клеток разной плоидности. Для исследования гетерогенных опухолей можно использовать методы интерфазной цитогенетики — весьма простой и доступный инструмент. Это позволяет установить корреляцию между генетическими абберациями и гистологическими особенностями опухолей.

- а. Методами интерфазной цитогенетики можно выявить тетраплоидизацию опухолей, в которых по данным проточной цитометрии никакой анеуплоидии не наблюдается.
- б. Эти методы позволяют обнаруживать «минорные» клеточные популяции в «диплоидных» опухолях, а также в опухолях, претерпевших тетраплоидизацию. При раке мочевого пузыря минорные фракции можно выявить по удвоению количественных хромосомных аббераций по сравнению с основной популяцией опухолевых клеток. Например, в клетках одной из минорных популяций, присутствующих в диплоидной переходно-клеточной карциноме, обнаружены четыре хромосомы 1 и две хромосомы 9, а в клетках основной популяции — две хромосомы 1 и одна хромосома 9 [49].
- в. Для выявления хромосомного несоответствия в минорной популяции опухолевых клеток можно использовать гибридизацию *in situ* с двумя мишенями (рис. 6.2), локализованными на разных хромосомах.

5. Заключение

В этой главе мы суммировали разные методики, с помощью которых можно исследовать клетки, выделенные из только что удаленных опухолей, а также парафиновые или криостатные срезы этих опухолей. Интерпретация результатов зависит в основном от способов обработки препаратов перед гибридизацией, а не от природы зонда. Мы использовали в своей работе зонды, специфичные в отношении высокоповторяющихся последовательностей. Для выявления аномалий в области коротких или длинных плеч хромосом нужны другие зонды, например фаговая ДНК [83—87], космиды [21, 51, 88—91], плазмиды [91] или искусственные хромосомы дрожжей [92, 93]. Предварительную обработку препаратов при гибридизации с этими зондами можно проводить в соответствии с протоколами, представленными в этой главе.

Литература

1. Koss L. G., Czernick B., Herz F., Wersto P. R. (1989). *Hum. Pathol.*, **20**, 528.
2. Cornelisse C. J., Tanke H. J. (1991). In: *Comprehensive cytopathology* (ed. M. Bibbo), p. 984. W. B. Saunders, Philadelphia.
3. Sandberg A. A., Turc-Carel C., Gemmill R. M. (1988). *Cancer Res.*, **48**, 1049.
4. Sandberg A. A. (1990). In: *The chromosomes in human cancer and leukemia* (2nd edn) (ed. A. A. Sandberg), p. 789. Elsevier, New York.
5. Teyssier J. R. (1989). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **37**, 103.
6. Cremer T., Landegent J., Bruckner A., Scholl H. P., Schardin M., Hager H. D. et al. (1986). *Hum. Genet.*, **74**, 346.
7. Hopman A. H. N., Ramaekers F. C. S., Raap A. K., Beck J. L. M., Devilee P., Van der Ploeg R. F., Vooijs G. P. (1988). *Histochemistry*, **89**, 307.
8. Devilee P., Thierry R. F., Kievits T., Kolluri R., Hopman A. H. N., Willard H. F. et al. (1988). *Cancer Res.*, **48**, 5825.
9. Cremer T., Tessin D., Hopman A. H. N., Manuelidis L. (1988). *Exp. Cell Res.*, **176**, 199.
10. Arnoldus E. P. J., Noordermeer I. A., Peters A. C. B., Raap A. K., Van der Ploeg M. (1991). *Cytogenet. Cell Genet.*, **56**, 214.
11. Van Dekken H., Pizzolo J. G., Kelsen D. P., Melamed M. R. (1990). *Cancer*, **66**, 491.
12. Nederlof P. M., Van der Flier S., Raap A. K., Tanke H. J., Van der Ploeg M., Kornips F., Geraedts J. P. M. (1989). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **42**, 87.
13. Poddighe P. J., Moesker O., Smeets D., Awwad B. H., Ramaekers F. C. S., Hopman A. H. N. (1991). *Cancer Res.*, **51**, 1959.
14. Giwerzman A., Hopman A. H. N., Ramaekers F. C. S., Skakkebaek N. E. (1990). *Am. J. Pathol.*, **136**, 497.
15. Anastasi J., Le Beau M. M., Vardivar J. W., Westbrook C. A. (1990). *Am. J. Pathol.*, **136**, 497.
16. Poddighe P. J., Ramaekers F. C. S., Hopman A. H. N. (1991). *J. Pathol.*, **166**, 215.
17. Van Dekken H., Pizzolo J. G., Reuter V. E., Melamed M. R. *Cytogenet. Cell Genet.*, **54**, 103.
18. Willard F. W., Waye J. S. (1987). *TIG*, **3**, 192.
19. Defilee P., Raap A. K., Cornelisse C. J. (1992). In: *Techniques in diagnostic pathology II* (ed. G. Bullock, D. van Velzen, M. J. Warhol, P. Herbrink) Academic Press. (In press).
20. Hopman A. H. N., Ramaekers F. C. S., Vooijs G. P. (1989). In: *In situ hybridization: principles and practice* (ed. J. M. Polak and J. O'D. McGee), p. 165. Oxford, Oxford University Press.
21. Trask B. J. (1991). *TIG*, **5**, 149.
22. Cooke H. J., Hindley J. (1979). *Nucleic Acid Res.*, **6**, 3177.
23. Waye J. S., Durfy S. J., Pinkel D., Kenwrick S., Patterson M., Davies K., Willard H. F. (1987). *Genomics*, **1**, 43.
24. Buroker N., Bestwick R., Haight G., Magenis R. E., Litt M. (1987). *Hum. Genet.*, **77**, 175.
25. Jabs E. W., Wolf S. F., Migeon B. R. (1984). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4884.
26. Waye J. S., Willard H. F. (1989). *Chromosoma*, **97**, 475.
27. Waye J. S., England S. B., Willard H. F. (1987). *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 349.
28. Dolon T., Wyman A. R., Mulholland J., Barker D., Burns G., Latt S., Botstein D. (1986). *Am. J. Hum. Genet. (Suppl. 39)*, A196.
29. Moyzis R. K., Albright K. L., Bartholdi M. F., Cram L. S., Deaven L. L., Hildebrand C. E. et al. (1987). *Chromosoma*, **95**, 375.
30. Devilee P., Kievitz T., Waye J. S., Pearson P. L., Willard H. F. (1988). *Genomics*, **3**, 1.

31. Looyenga L. H. J., Smit V. T. H. B. M., Wessels J. W. (1990). *Cytogenet. Cell Genet.*, **54**, 216.
32. Higgins M. J., Wang H., Shtromas I., Haliotis T., Roder J. C., Holden J. J. A., White B. N. (1985). *Chromosoma*, **93**, 77.
33. Waye J. S., Willard H. F. (1986). *Nucleic Acid Res.* **14**, 6915.
34. Devilee P., Cremer T., Slagboom P., Bakker E., Scholl H. P., Hager H. D. et al. (1986). *Cytogenet. Cell Genet.*, **41**, 193.
35. Werrick R., Willard H. F. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9394.
36. Metzdorf R., Gottfert E., Blin N. (1988). *Chromosoma*, **97**, 154.
37. Willard H. F., Smith K. D., Sutherland J. (1983). *Nucleic Acids Res.*, **11**, 2017.
38. Lau Y. F. (1985). *Cytogenet. Cell Genet.*, **39**, 184.
39. Wolfe J., Darling S. M., Erickson R. P., Craig I. W., Buckle V. J., Rigby P. W. et al. (1985). *J. Mol. Biol.*, **182**, 477.
40. Cooke H. J., Schmidke J., Gosden J. R. (1982). *Chromosoma*, **87**, 491.
41. Hopman A. H. N., Raap A. K., Landegent J. E., Wiegant J., Boerman R. H., Van der Ploeg M. (1989). In: *Molecular neuroanatomy* (ed. F.W. Van Leeuwen, R.M. Buijs, C. W. Pool and O. Pach), p. 43, Elsevier, Amsterdam.
42. Raap A. K., Hopman A. H. N., Van der Ploeg M. (1989). In: *Techniques in immunocytochemistry, Vol 4* (ed. G. R. Bullock and P. Petrusz), p. 167. Cambridge University Press, Cambridge.
43. Raap A. K., Arnoldus E. P. J., Nederlof P. M., Smit V. T. H. B. M., Cornelisse C. J., Van der Ploeg M. (1990). In: *Transactions of the Royal Microscopic Society* (ed. H. Y. Elder), p. 661. London.
44. Bauman J. G. J., Pinkel D., Trask P. J. (1989). In: *Flow cytogenetics* (ed. J. Gray), p. 275. Academic Press, San Diego.
45. Pinkel D., Landegent J., Collins C., Fuscoe J., Segraves R., Lucas J., Gray J. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9138.
46. Hopman A. H. N., Wiegant J., Raap A. K., Landegent J. E., Van der Ploeg M., Van Duijn P. (1986). *Histochemistry*, **85**, 1.
47. Nederlof P. M., Robinson D., Abuknesha R., Wiegant J., Hopman A. H. N., Tanke H. J., Raap A. K. (1989). *Cytometry*, **10**, 20.
48. Emmerich P., Loos P., Jauch A., Hopman A. H. N., Wiegant J., Hoggins M. et al. (1989). *Exp. Cell Res.*, **181**, 126.
49. Hopman A. H. N., Moesker O., Smeets W. G. B., Pauwels R. P. E., Vooijs G. P., Ramaekers F. C. S. (1991). *Cancer Res.*, **51**, 644.
50. Nederlof P. M., Van der Flier S., Wiegant J., Raap A. K., Tanke H. J., Ploem J. S., Van der Ploeg M. (1990). *Cytometry*, **11**, 126.
51. Arnoldus E. P. J., Wiegant J., Noordermeer I. A., Wessels J. W., Beverstock G. C., Grosveld G. C. et al. (1990). *Cytogenet. Cell Genet.*, **54**, 108.
52. Raap A. K., Geelen J. L., Van der Meer J. W. M., Van de Rijke F. M. (1988). *Histochemistry*, **88**, 367.
53. Van Prooijen-Knegt A. C., Raap A. K., Van der Burg M. J. M., Vrolijk J., Van der Ploeg M. (1982). *Histochem. J.*, **14**, 333.
54. Feitz W. F. J., Beck H. L. M., Smeets A. W. G. B., Debruyne F. M. J., Vooijs G. P., Herman C. J., Ramaekers F.C.S. (1985). *Int. J. Cancer*, **36**, 349.
55. Smeets A. W. G., Pauwels R. P. E., Beck H. L. M., Feitz W. F. J., Geraedts J. P. M., Debruyne F. M. J. et al. (1987). *Cytometry*, **8**, 14.
56. Hopman A. H. N., Poddighe P., Smeets W., Moesker O., Beck J., Vooijs G. P., Ramaekers F. C. S. (1989). *Am. J. Pathol.*, **135**, 1105.

57. Burns J., Redfern D. R. M., Esiri M. M., McGee J. O'D. (1986). *J. Clin. Pathol.*, **39**, 1066.
58. Burns J., Chan V. T. W., Johansson J. H., Fleming K. A., Taylor S., McGee J. O'D. (1985). *J. Clin. Pathol.*, **38**, 1085.
59. Naoumov N. V., Alexander G. J. M., Eddleston A. L. W. F., Williams R. (1988). *J. Clin. Pathol.*, **41**, 793.
60. Pringle J. H., Homer C. E., Warford A., Kendall C. H., Lauder I. (1987). *Histochem. J.*, **19**, 488.
61. Emmerich P., Jauch A., Hofmann M.-C., Cremer T., Walt H. (1989). *Lab. Invest.*, **61**, 235.
62. Walt H., Emmerich P., Cremer T., Hofmann M.-C., Bannwart F. (1989). *Lab. Invest.*, **61**, 235.
63. Hopman A. H. N., Van Hooren E., Van de Kaa C. A., Vooijs G. P., Ramaekers F. C. S. (1991). *Modern Pathol.*, **4**, 503.
64. Arnoldus E. P. J., Peters A. C. B., Bots G. T. A. M., Raap A. K., Van der Ploeg M. (1989). *Hum. Genet.*, **83**, 231.
65. Arnoldus E. P. J., Noordermeer I. A., Peters A. C. B., Raap A. K., Van der Ploeg M. (1991). *Cytogenet. Cell Genet.*, **56**, 214.
66. Smeets D. F. C. M., Merckx G. F. M., Hopman A. H. N. (1991). *Hum. Genet.*, **87**, 45.
67. Merckx G. F. M., Hopman A. H. N., Akermans-Scholten A. C. M., Smeets D. F. C. M. (1990). *Cytogenet. Cell Genet.*, **54**, 62.
68. Atkin N. B., Brito-Babapulle V. (1981). *Cancer Genet. Cytogenet.*, **3**, 261.
69. Hsu L. Y. F., Benn P. A., Tannenbaum H. L., Perlis T. E., Carlson A. D. (1987). *Am. J. Med. Genet.*, **26**, 95.
70. Arnoldus E. P. J., Dreef E. J., Noordermeer I. A., Verheggen M. M., Thiery R., Peters A. C. B. et al. (1991). *J. Clin. Pathol.*, **44**, 900.
71. Anastasi J., Thangavelu M., Vardiman J. W., Hooberman A. L., Larson R. A., LeBeau M. M. (1991). *Blood*, **77**, 1087.
72. Kolluri R. V., Manuelidis L., Cremer T., Sait S., Cezer S., Raza A. (1990). *Am. J. Hematol.*, **33**, 117.
73. Anastasi J., Vardiman J. W., Rudinsky R., Patel M., Nachman J., Rubin C. M., LeBeau M. M. (1991). *Blood*, **77**, 2456.
74. Kibbelaar R. E., Van Kamp H., Dreef E. J., Wessels J. W., Beverstock G. C., Raap A. K. et al. (1991). *Cytogenet. Cell Genet.*, **56**, 132.
75. Van Dekken H., Hagenbeek A., Bauman J. G. J. (1989). *Leukemia*, **3**, 724.
76. Van Dekken H., Bauman J. G. J. (1989). *Cytogenet. Cell Genet.*, **78**, 251.
77. Losada A. P., Wessman M., Tiiainen M., Hopman A. H. N., Willard H. F., Sole F., Caballin M. R., Woessner S., Knuutila S. (1991). *Blood*, **78**, 775.
78. Arnoldus E. P. J., Noordermeer I. A., Peters A. C. B., Voormolen J. H. C., Bots G. T. A. M., Raap A. K., Van der Ploeg M. (1991). *Genes Chrom. Cancer*, **3**, 101.
79. Arnoldus E. P. J., Peters A. C. B., Bots G. T. A., Raap A. K., Van der Ploeg M. (1989). *Hum. Genet.*, **83**, 231.
80. Waldman F. M., Carroll P. R., Kerschmann R., Cohen M. B., Field F. G., Mayall B. H. (1991). *Cancer Res.*, **51**, 3807.
81. Smit V. T. H. B. M., Wessels J. W., Mollevanger P., Schrier P. I., Raap A. K., Beverstock G. C., Cornelisse C. J. (1990). *Cytogenet. Cell Genet.*, **54**, 20.
82. Van de Kaa C. A., Nelson K. A. M., Ramaekers F. C. S., Vooijs G. P., Hopman A. H. N. (1991). *J. Pathol.*, **165**, 281.

83. Smit V. T. H. B. M., Wessels J. W., Mollevanger P., Dauwerse J. D., Van Vliet M., Beverstock G. C. et al. (1992). *Genes Chrom. Cancer*. (In press).
84. Cremer T., Lichter P., Borden J., Ward D. C., Manuelidis L. (1988). *Hum. Genet.*, **80**, 235.
85. Lichter P., Cremer T., Borden J., Manuelidis L., Ward D. C. (1988). *Hum. Genet.*, **80**, 223.
86. Lichter P., Cremer T., Chang Tang C.-J., Watkins P.C., Manuelidis L., Ward D. C. (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 9664.
87. Suijkerbuijk R. F., Van de Veen A. Y., Van Echten J., Buijs C. H. C. M., DeLong B., Oosterhuis J. W. et al. (1991). *Am. J. Hum. Genet.*, **48**, 269.
88. Tkachuk D. C., Westbrook C. A., Andreeff M., Donton T. A., Cleary M. L., Suryanarayan K. et al. (1990). *Science*, **250**, 559.
89. Djabali M., Ngryen C., Roux D., Demengeot J., Yang H. M., Jordan B. R. (1990). *Nucleic Acid. Res.*, **18**, 6166.
90. Lichter P., Chang Tang C.-J., Call K., Hermanson G., Evans G. A., Housman D., Ward D. C. (1990). *Science*, **247**, 64.
91. Wiegant J., Ried T., Nederlof P. M., Van der Ploeg M., Tanke H. J., Raap A. K. R. (1991). *Nucleic Acid Res.*, **19**, 3237.
92. Selleri L., Hermanson G. G., Eubanks J. H., Evans G. A. (1991). *Genet. Anal-Tech. Appli.*, **8**, 59.
93. Dauwerse J. G., Kievitis T., Beverstock G. C., Van der Keur D., Smit E., Wessels H. W. et al. (1990). *Cytogenet. Cell Genet.*, **53**, 126.
94. Beck J. L. M., Hopman A. H. N., Vooijs G. P., Ramaekers F. C. S. (1992). *Cytometry*, **13**, 346.
95. Speel E. J. M., Schutte B., Ramaekers F. C. S., Hopman A. H. N. (1992). *J. Histochem. Cytochem.*, **40**, 135.
96. Waldman F. M., Carrole P. R., Kerschmann R., Cohen M. B., Field F. G. (1991). *Cancer Res.*, **51**, 3807.
97. Babu V.R., Viktor A. (1991). *Cytogenet. Cell Genet.*, **57**, 16.

ЛОКАЛИЗАЦИЯ КЛЕТОЧНЫХ мРНК В КЛИНИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ С ПОМОЩЬЮ ИЗОТОПНО МЕЧЕННЫХ РНК-ЗОНДОВ

К. А. Хамид

1. Введение

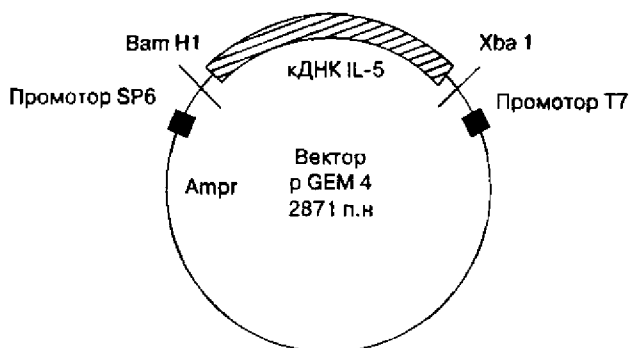
Метод гибридизации *in situ* позволяет определить клеточную локализацию специфических нуклеиновых кислот (ДНК и РНК) с помощью меченых комплементарных зондов. Впервые этот метод был предложен в 1969 г. [1] и вначале применялся для выявления ДНК, а сейчас его используют и для локализации мРНК. Это дает возможность получать очень ценную информацию об экспрессии генов в клетке и о синтезе в ней определенных белков. Для выявления мРНК применяют разные зонды: одно- и двухцепочечные ДНК, олигонуклеотиды, комплементарную РНК (гл. 4, 5, 8). При этом РНК-зонды обладают рядом преимуществ по сравнению с зондами других типов [2, 3, 4]. Так, они имеют известный размер, не содержат векторных последовательностей, образуют специфические термостабильные дуплексы РНК—РНК, при работе с ними можно удалять негибридизовавшуюся РНК с помощью РНКазы. Все это существенно повышает специфичность и чувствительность гибридизации. В этой главе мы рассмотрим практические аспекты применения РНК-зондов (в первую очередь изотопно меченных) для локализации мРНК в клинических препаратах.

2. Получение зондов

На рис. 7.1 и 7.2 схематически представлена процедура получения изотопно меченных РНК-зондов.

2.1. Субклонирование ДНК-матриц в векторе для синтеза РНК

Для получения одноцепочечных антисмысловых, или кРНК-, зондов необходимо использовать специальные транскрипционные векторы, которые содержат один или два узнаваемых РНК-полимеразами промотора, обеспечивающих транскрипцию мРНК



Полимераза SP6: антисмысловая последовательность
 Полимераза T7: смысловая последовательность

Рис. 7.1. Схема субклонирования кДНК интерлейкина-5 (IL-5) в векторе рGEM.

с субклонированной в вектор вставки. С 3'-стороны от промоторов РНК-полимераз расположен полилинкер, позволяющий легко проводить субклонирование ДНК (рис. 7.1). Для получения специфических кРНК кДНК-матрица должна иметь в транскрипционном векторе ориентацию, обратную к ориентации промоторных участков.

Векторы рGEM и Bluescribe содержат полилинкер, который фланкирован промоторами, узнаваемыми РНК-полимеразами. Это дает возможность проводить транскрипцию ДНК-вставки в обоих направлениях, получая при этом как антисмысловые (зонды, комплементарные мРНК), так и смысловые (зонды, идентичные мРНК) РНК-последовательности в зависимости от того, какая полимераз используется.

2.2. Линеаризация вектора

Для получения РНК-транскриптов нужного размера, не содержащих или почти не содержащих неспецифических векторных последовательностей, вектор переводят в линейную форму. Для этого расщепляют его в сайте, расположенном либо внутри вставки, либо с 3'-стороны от нее. Обычно для линеаризации используют рестриктазы, сайты узнавания которых входят в полилинкер.

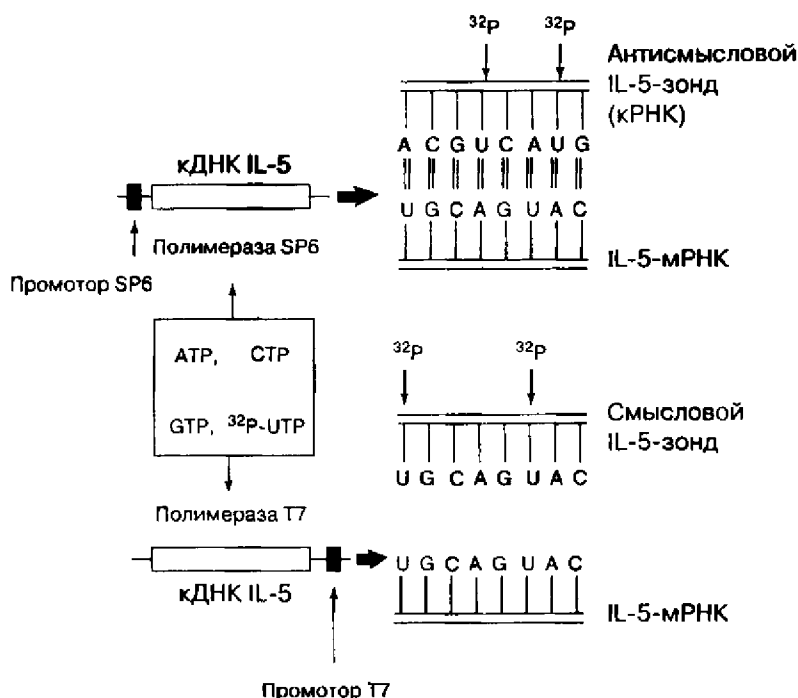


Рис. 7.2. Схематическое представление синтеза и мечения смысловых и антисмысловых РНК-зондов.

2.3. Транскрипция *in vitro* и мечение зондов

Для получения изотопно меченного одноцепочечного РНК-зонда необходимо транскрибировать кДНК с помощью соответствующей РНК-полимеразы в присутствии изотопно меченных нуклеотидов [5] (рис. 7.2). Методика транскрипции *in vitro* описана в протоколе 7.1. Дополнительную информацию можно найти также в гл. 13.

Протокол 7.1. Получение меченых РНК-зондов с помощью транскрипции *in vitro*

Для приготовления всех реактивов используют воду, обработанную ДЭПК (гл. 8).

Материалы

- 5 × транскрипционный буфер: 200 мМ трис-НСl, рН 7,5, 30 мМ MgCl₂, 10 мМ спермидин, 5 мМ NaCl

Протокол 7.1 (Продолжение)

- 100 мМ дитиотрейтол (ДТТ)
- РНКазин: ингибитор РНКаз из плаценты человека, 25 ЕД/мкл
- Смесь нуклеотидов: по 2,5 мМ АТР, ГТР и УТР
- 100 мкМ СТР («холодный» СТР)
- Буфер ТЭ: 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА
- Линеаризованная плазмидная ДНК (1 мкг/мкл) в обычной или дистиллированной воде
- ^{32}P - или ^{35}S -СТР, 10 мКи/мл. Можно также использовать ^{32}P - или ^{35}S -УТР, но при этом необходимо изменить состав смеси нуклеотидов
- РНК-полимеразы фагов SP6, Т3 или Т7 в зависимости от используемого вектора. Все эти ферменты очень лабильны; их можно держать вне холодильника минимальное время
- Свободная от РНКаз ДНКаз (например, фирмы Boehringer Mannheim)
- тРНК: 10 мкг/мкл
- 4 М NaCl
- Фенол : хлороформ (1:1, о/о)

Методика

1. В стерильную микроцентрифужную пробирку при комнатной температуре вносят в указанном порядке следующие реактивы.

• 5 × транскрипционный буфер	4 мкл
• ДТТ	2 мкл
• РНКазин	0,8 мкл
• Смесь нуклеотидов	4 мкл
• «Холодный» СТР	2,4 мкл
• Плазмидная ДНК	1 мкл
• Радиоактивно меченный СТР	5 мкл
• РНК-полимераза	1 мкл (10 ЕД)
• Обработанная ДЭПК вода	20 мкл

 до конечного объема
2. Инкубируют реакционную смесь в течение 1 ч при 37 °С, затем для ускорения транскрипции вносят еще 0,5 мкл (5 ЕД) РНК-полимеразы и продолжают инкубацию 30 мин.
3. Для остановки транскрипции добавляют 1 мкл ДНКазы, свободной от РНКаз, которая расщепляет ДНК-матрицу, и инкубируют 10 мин при 37 °С.
4. Для разделения зонда и невключившихся нуклеотидов¹⁾ к реакционной смеси добавляют:

- тРНК 1 мкл
 - обработанную ДЭПК воду 175 мкл
 - 4 М NaCl 5 мкл
 - равный объем (примерно 200 мкл) смеси фенол:хлороформ (1:1)
5. Реакционную смесь перемешивают, центрифугируют 5 мин при 12 000 g в микроцентрифуге и удаляют водную фазу (примерно 200 мкл). Повторяют экстракцию равным объемом хлороформа.
 6. Добавляют к супернатанту 100 мкл 7 М ацетата аммония (до конечной концентрации 2,5 М) и 750 мкл (примерно 2,5 объема) холодного (из морозильника на -20°C) абсолютного этанола, перемешивают и для образования осадка оставляют на ночь при -20°C или на 2 ч при -80°C .
 7. Собирают РНК центрифугированием при 12 000 g в течение 20 мин и удаляют супернатант. Осадок РНК подсушивают под вакуумом, затем растворяют его в 20 мкл обработанной ДЭПК воды¹⁾. Отбирают 1 мкл раствора для определения радиоактивности.
 8. ^{32}P -зонды хранят при -20°C , а ^{35}S -зонды — при -80°C .
 9. Определяют радиоактивность аликвоты раствора зонда с помощью β -счетчика (если необходимо — с использованием сцинтилляторов) и вычисляют удельную радиоактивность зонда так, как это описано в гл. 13.

¹⁾ Зонд можно также очистить хроматографией на сефадексе G-50 (гл. 13).

²⁾ ^{35}S -РНК-зонды лучше растворять в 100 мМ ДТТ, приготовленном на ДЭПК-воде.

2.4. Выбор радиоактивной метки

Выбор изотопа для мечения зонда определяется компромиссом между теми чувствительностью и разрешением, которые хотят получить [6]. Для повышения чувствительности лучше использовать изотопы ^{32}P или ^{35}S . Однако их недостатком является то, что испускаемые ими высокоэнергетические β -частицы до своего поглощения проходят в фотоэмульсии весьма большое расстояние, образуя на своем пути зерна серебра, так что разрешение радиоавтографов снижается. Такие изотопы, как ^3H , испускающие низкоэнергетическое излучение, позволяют получать хорошее разрешение, но требуют длительной экспозиции. В табл. 7.1 приведены основные характеристики некоторых изотопов, используемых для мечения мРНК-зондов.

Таблица 7.1. Характеристики изотопов, используемых для мечения РНК-зондов¹⁾

Изотоп	Период полураспада	Удельная радиоактивность, Ки/ммоль	Энергия излучения, МэВ	Примечание
³² P	14 сут	400–6000	1,71	Позволяет быстро (за 2–3 сут) получить результаты, но с низким разрешением
³⁵ S	87 сут	400–1500	0,16	Экспозиция 8–15 сут, среднее разрешение, высокий фон (если не приняты специальные меры по его снижению)
³ H	12 лет	25–100	0,018	Длительная (2–3 мес) экспозиция, высокое разрешение. Можно использовать для внутриклеточной локализации

¹⁾ При ГИС иногда используют такие радиоактивные изотопы, как ³³P и ¹²⁵I

2.5. Размер зонда

Размер зонда, образующегося при транскрипции, влияет как на способность его проникать в клетку, так и на эффективность гибридизации с последовательностями мРНК, находящимися в комплексе с рибосомами и ковалентно сшитыми с клеточным матриксом. В случае клеток, фиксированных параформальдегидом, можно использовать зонды разного размера. Это согласуется с данными о том, что при фиксации клеток и тканей параформальдегидом образуется сравнительно небольшое число ковалентных сшивок и сохраняется высокая проницаемость ткани. Достаточно хорошие результаты получаются при размере зонда от 100 до 400 нуклеотидов. Зонд длиной более 500 нуклеотидов необходимо подвергнуть ограниченному щелочному гидролизу, чтобы уменьшить его размер до 150–200 нуклеотидов [2].

3. Подготовка тканей

3.1. Работа с тканями

Необходимо исключить попадание в ткань РНКазы. Этот фермент в больших количествах присутствует на коже человека, поэтому все манипуляции следует проводить в перчатках. По возможности

для приготовления препаратов нужно использовать стерильные ножи, посуду и реактивы. Ткани должны быть как можно более свежими, время между получением препарата и началом его обработки не должно превышать 30 мин. Если препарат имеет большие размеры, его необходимо разрезать на кусочки (примерно $1 \times 1 \times 0,5$ см), чтобы облегчить проникновение в ткань фиксирующих растворов.

3.2. Фиксация

Первым этапом в проведении гибридизации *in situ* является фиксация ткани, цитологического препарата или культуры клеток. Фиксация не должна нарушать морфологию ткани, в то же время необходимо заботиться о максимальном доступе к мРНК гибридизационного зонда в достаточно жестких условиях. Для гибридизации *in situ* используют такие фиксаторы, как параформальдегид, глутаральдегид, забуференный формамид, раствор Боуэна, этанол/уксусную кислоту. Мы предпочитаем работать с 4% параформальдегидом, сохраняющим морфологию ткани и не мешающим гибридизации. Для приготовления фиксатора параформальдегид (твердый порошкообразный формальдегид) растворяют в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при температуре не более 56°C в течении 60–90 мин. Свежеприготовленный фиксатор необходимо использовать как можно быстрее, поскольку при хранении параформальдегид распадается с образованием нескольких соединений (в том числе муравьиной кислоты, ухудшающей сохранность мРНК в тканях). Время фиксации определяется типом ткани и составляет 30 мин для цитологических препаратов, 2 ч для эндоскопических биоптатов и 4 ч для образцов, полученных при хирургических операциях или аутопсии. При чрезмерной фиксации тканей происходит маскирование мРНК и тем самым ослабляется гибридизационный сигнал. После фиксации ткань промывают в 2–3 сменах 15% сахарозы в ФСБ, замораживают или заливают в парафиновые блоки. При оптимальном сохранении морфологии залитых в парафин препаратов степень гибридизации в них может быть ниже, чем в срезах замороженной ткани, поэтому мы рекомендуем использовать для получения срезов криостатные блоки. Их можно хранить при -80°C , но наилучшие результаты дает приготовление срезов в пределах 2 нед после фиксации.

3.3. Обработка предметных стекол

Предварительная обработка предметных стекол, во-первых, снижает неспецифичное связывание с ними радиоактивно меченного зонда и, во-вторых, повышает сохранность срезов и самих

стекол при работе. В разных лабораториях применяют разные методы очистки предметных стекол и их последующей обработки (см. также гл. 4), а для некоторых тканей подбор условий для обеспечения их нормальной адгезии с предметным стеклом представляет достаточно серьезную проблему. Мы рекомендуем покрывать стекла поли-L-лизинном (ПЛЛ) (протокол 7.2).

Протокол 7.2. Очистка предметных стекол и их обработка поли-L-лизинном

1. Промывают матовые с одного конца предметные стекла в течение 20 мин в 1 М HCl.
 2. Ополаскивают в деионизованной воде.
 3. Заливают на 20 мин 100% этанолом.
 4. Высушивают при комнатной температуре и автоклавируют для полного удаления следов рибонуклеаз.
 5. Перед получением срезов покрывают стекла PLL (мол. масса 150–30 000) и используют их в первые 24 ч после обработки.
-

3.4. Получение срезов

Получение криостатных срезов и подготовка цитологических препаратов описаны в протоколе 7.3.

Протокол 7.3. Получение криостатных срезов и цитологических препаратов

А. Получение криостатных срезов (процедура фиксации описана в разд. 3.2)

1. Делают срезы толщиной 15 мкм и монтируют их на предварительно подготовленных предметных стеклах.
2. Предметные стекла помещают в чистый держатель.
3. Накрывают держатель фольгой и инкубируют при 37 °C в течение ночи.
4. Срезы используют на следующий день или хранят их при –80 °C до 12 мес.

Б. Цитологические препараты

1. Суспензию клеток (10^6 клетка/мл) собирают на покрытых PLL предметных стеклах центрифугированием.
2. Подсушивают предметные стекла в течение 5 мин и фиксируют в 4% параформальдегиде в течение 30 мин (см. гл. 4).

3. Промывают стекла 2 раза по 30 мин в двух сменах 15% (в/о) сахарозы на фосфатно-солевом буфере (10 мМ фосфатный буфер, pH 7,2, 150 мМ NaCl), высушивают их при 37 °C и хранят при комнатной температуре.

4. Предварительная обработка клеток и тканей

Прежде чем проводить гибридизацию *in situ*, исследуемый препарат необходимо подвергнуть соответствующей обработке (см. также гл. 4). Такая обработка необходима для того, чтобы повысить доступность последовательности-мишени для зонда. Большинство описанных здесь методов направлено на повышение проницаемости фиксированного белкового клеточного материала и состоит в использовании протеазы, кислот и детергентов. Обработка другого рода имеет своей целью снижение фонового окрашивания и основана на использовании ингибиторов неспецифического окрашивания нуклеиновых кислот, в частности на предгибридизации с уксусным ангидридом и формамидом. Используемая нами процедура предгибридизации описана в протоколе 7.4.

Протокол 7.4. Предгибридизационная обработка клеток и тканей

Материалы

- ФСБ (см. протокол 7.3)
- Протеиназа К (например, Boehringer Mannheim)
- 100 мМ трис-HCl, pH 8,0, 50 мМ ЭДТА
- 4% параформальдегид в ФСБ (см. гл. 4)
- 0,25% уксусный ангидрид, 0,1 М триэтаноламин, pH 8,0 (для ³²P-зондов)
- 10 мМ иодацетамид
- 10 мМ N-этилмалеимид
- Деионизованный формамид (см. гл. 4)
- 20 × SSC: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат Na, pH 7,0

Методика

1. Регидратируют препарат в ФСБ в течение 5 мин.
2. Погружают в ФСБ, содержащий 0,1 М глицин, на 5 мин, затем в ФСБ, содержащий 0,3% тритон X-100, на 10 мин.
3. Промывают в двух сменах ФСБ в течение 3 мин.

Протокол 7.4 (Продолжение)

4. Инкубируют при 37 °С в течение 30 мин с протеиназой К (1 мкг/мл), разведенной в буфере 100 мМ трис-НСl, рН 8,0, 50 мМ ЭДТА. Этот этап очень важен, и возможно, понадобится изменить концентрацию протеиназы и время инкубации, оптимизировав их для данного препарата.
 5. Проводят постфиксацию в 4% параформальдегиде, приготовленном в ФСБ, в течение 4 мин.
 6. Промывают в двух сменах ФСБ, по 3 мин в каждой смене.
 7. Погружают на 10 мин в 0,25% уксусный ангидрид, 0,1 М триэтаноламин, рН 8,0, если работают с ³²P-зондами. При работе с ³⁵S-зондами препараты обрабатывают в течение 30 мин смесью 10 мМ иодацетамида и 10 мМ N-этилmaleимид, чтобы уменьшить неспецифическое связывание зонда.
 8. Проводят предгибридизацию при 37 °С в течение по крайней мере 15 мин с 50% формамидом, 2 × SSC, рН 7.0.
-

5. Гибридизация

Условия гибридизации подбирают таким образом, чтобы обеспечить доступ зонда к последовательности-мишени, необходимую жесткость условий и сохранность тканей (см. гл. 4). Мы в своей работе используем процедуру, описанную в протоколе 7.5.

Протокол 7.5. Гибридизация мНРК с кРНК-зондами

Материалы

Все реагенты должны быть приготовлены на воде, обработанной ДЭПК.

- Деионизованный формамид (см. гл. 4)
- 100 × раствор Денхардта: 2% (в/о) БСА, 2% (в/о) фиколл-400, 2% (в/о) поливинилпирролидин 360
- ДНК спермы лосося: 10 мг/мл, фрагментирована автоклавированием или с помощью ультразвука
- 50% (в/о) дектансульфат в ДЭПК-обработанной воде
- Гибридизационный буфер: 50% деионизованный формамид, 5 × раствор Денхардта, 10% дектансульфат, 0,5% пиродифосфат натрия, 0,5% ДСН. ДНК спермы лосося денатурируют кипячением в течение 10 мин и добавляют в буфер перед гибридизацией до конечной концентрации 250 мкг/мл. При работе с ³⁵S-зондами добавляют ДТТ до конечной концентрации 100 мМ

- Радиоактивный РНК-зонд
- Гибридизационная смесь: 9 объемов гибридизационного буфера и 1 объем раствора, содержащего кРНК-зонд в концентрации, достаточной для достижения активности $(0,5-1) \cdot 10^6$ имп./мин на срез. Если это нужно, перед добавлением в гибридизационную смесь зонд разбавляют в ДЭПК-воде
- Покровные стекла, покрытые диметилхлорсиланом (см. гл. 4)

Методика

1. Слегка подсушивают стекла (не пересушивая!)
2. Наносят 20 мкл гибридизационной смеси, предварительно прогретой при 37 °С.
3. Накрывают срез покровным стеклом, покрытым диметилхлорсиланом.
4. Инкубируют во влажной атмосфере при 37–43 °С в течение 16 ч (или в течение ночи).

6. Отмывание препаратов после гибридизации

Условия отмывания задают жесткость процедуры гибридизации *in situ* (см. гл. 4). Они обеспечивают диффузию реагентов, фиксированных в срезе, и отбор достаточно совершенных гибридов между зондом и мРНК-мишенью. Процедура отмывания, которой мы следуем, описана в протоколе 7.6.

Протокол 7.6. Отмывание препаратов после гибридизации

Материалы

- 20 x SSC: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат Na, pH 7,0
- Маточный раствор РНКазы: 10 мг/мл в дистиллированной воде. Хранят при – 20 °С
- Раствор РНКазы А: 20 мкг/мл РНКазы А в 0,5 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА
- 70%, 90% и 100% этанол, содержащий 0,3 М ацетат аммония

Методика

1. Снимают покровные стекла, погрузив препараты в 4 x SSC.
2. Промывают стекла в трех сменах 4 x SSC при 40 °С в течение 20 мин в каждой смене, аккуратно помешивая раствор.
3. Удаляют негибридизовавшийся одноцепочечный кРНК-зонд инкубированием в растворе РНКазы в течение 30 мин при 37°C¹⁾.

Протокол 7.6 (Продолжение)

4. Промывают стекла в $2 \times \text{SSC}$ в течение 30 мин при 40°C , затем в $0,1 \times \text{SSC}$ в течение 30 мин при 40°C .
5. Проводят дегидратацию в 70%, 90%, затем в двух сменах 100% этанола, содержащего 0,3 М ацетат аммония, в течение 10 мин при комнатной температуре.
6. Высушивают стекла на воздухе при комнатной температуре в течение 1 ч.

¹⁾ Неспецифическое связывание можно существенно уменьшить, если обработать срезы РНКазой, избирательно расщепляющей негибридизовавшиеся участки РНК.

7. Радиоавтография

В опытах по гибридизации *in situ* используют эмульсию Ilford K5 (Kodak, UK). При комнатной температуре эта эмульсия полутвердая и становится жидкой при нагревании до 42°C с равным объемом дистиллированной воды.

Саму эмульсию и экспонируемые срезы нужно держать в холодильнике, который никогда не используется для хранения других радиоизотопов: если в том же холодильнике находится даже сильно разбавленный раствор ^{32}P , это быстро приведет к появлению недопустимо высокого фона [7].

Рекомендуемая нами процедура радиоавтографии описана в протоколе 7.7.

Протокол 7.7. Радиоавтография срезов

1. Сосуд с эмульсией и камеру для погружения срезов помещают на 10–15 мин в водяную баню с температурой 45°C , чтобы расплавить эмульсию. Затем медленно, не допуская образования пузырьков воздуха, эмульсию выливают в камеру для погружения срезов.
2. Срезы погружают в эмульсию и ставят их торцом в штатив.
3. Высушивают срезы на воздухе в течение как минимум 3 ч. Это время можно уменьшить до 1 ч, если использовать для подсушивания неискрящий фен.
4. Высушенные срезы хранят в светонепроницаемой пластиковой коробке с небольшим количеством силикагеля. Заклеивают коробку черной изолентой и экспонируют ее в хорошо защищенном от света контейнере при 4°C . При повышенной влажности может произойти «выцветание» изображения, и

если сигнал очень слабый, «выцветание» и проявление могут компенсировать друг друга. Если же влажность невелика, то при длительной экспозиции можно выявить и очень слабый сигнал. Время экспозиции варьирует от нескольких часов до нескольких суток, и чтобы оптимизировать его, необходимо иметь несколько одинаковых срезов, при проявлении которых через определенное время можно подобрать наиболее удачное время экспозиции.

5. Полученные радиоавтографы лучше проявлять при температуре 18–20 °С, хотя этот температурный диапазон не критичен, просто при более низких температурах образуются зерна серебра меньшего размера. Важнее, чтобы срезы, проявитель, закрепитель и другие растворы имели одинаковую температуру, поскольку при резком ее изменении может произойти сморщивание эмульсии. Проявление осуществляют по следующей схеме:

- а) проявитель Kodak D19: 2,5 мин;
- б) «стоп»-ванна (вода): 30 с;
- в) быстрый закрепитель Kodak: 5 мин;
- г) промывание в дистиллированной воде: 15 мин (можно проводить при дневном освещении);
- д) при проявлении срезов аккуратно перемешивают проявитель, покачивая ванну вперед-назад (6 с — покачивание, 6 с — покой). Благодаря этому концентрация проявителя не уменьшается вблизи участков среза с высокой плотностью зерен серебра. Срезы лучше покачивать и при закреплении и отмывании, однако на этих этапах перемешивание не столь критично, как во время проявления;
- е) сразу после последнего промывания окрашивают срезы гематоксилином.

8. Одновременное проведение гибридизации in situ и иммуноцитохимического анализа

Чтобы более полно исследовать экспрессию того или иного гена, можно одновременно локализовать как нуклеиновую кислоту, так и соответствующий ей белок. Для этого анализируют серийные срезы поочередно методом гибридизации in situ и иммуноцитохимическим методом или, что более эффективно, одновременно проводят обе процедуры на одном срезе или клеточном препарате [8, 9]. Один из вариантов такого анализа описан в протоколе 7.8.

Протокол 7.8. Одновременное проведение гибридизации *in situ* и иммуоцитохимического анализа

1. Прогревают срезы или клеточные препараты, как это описано в протоколе 7.3.
2. Проводят гибридизацию с изотопно меченной антисмысловой РНК ($1,5 \cdot 10^6$ имп./мин), разведенной в буфере без декстран-сульфата, в течение 16 ч при 45 °С (см. протокол 7.5).
3. Промывают срезы в $4 \times \text{SSC}$ в течение 1 ч при 37 °С и инкубируют их в растворе РНКазы А 30 мин при 37 °С (см. протокол 7.6).
4. Промывают срезы 15 мин в $2 \times \text{SSC}$ и 15 мин в $0,1 \times \text{SSC}$.
5. Проводят иммунологическое окрашивание срезов (мы рекомендуем ПАП- и АВС-методы; см. гл. 2).
6. Для проведения радиоавтографии срезы покрывают эмульсией К5 и экспонируют 5–7 сут в случае изотопа ^{32}P и как минимум 15 сут в случае изотопа ^{35}S . Затем срезы проявляют, окрашивают гематоксилином и накрывают покровными стеклами (см. протокол 7.7).

9. Контроли и специфичность гибридизации *in situ*

Как и другие гистохимические методы анализа, гибридизация *in situ* должна сопровождаться проведением соответствующих контрольных экспериментов, в первую очередь на анализируемую ткань, зонд и все реактивы (см. также гл. 2 и 4).

9.1. Ткань

Тканевой препарат должен быть приготовлен таким образом, чтобы обеспечивалась максимальная сохранность нуклеиновых кислот в срезе. Для контроля проводят гибридизацию с зондами, заведомо хорошо гибридизующимися с исследуемой тканью, используя дополнительные срезы.

Кроме того, ткань нужно проверить на наличие специфической мРНК с помощью Нозерн-блот-гибридизации. Этот контроль особенно важен, когда нужно убедиться в полном отсутствии специфической гибридизации или изменении содержания мРНК при тех или иных физиологических условиях. Но следует иметь в виду, что при Нозерн-блот-гибридизации определяется содержание мРНК в больших, часто гетерогенных клеточных популяциях,

а методом ГИС мРНК иногда выявляется в таком небольшом числе клеток, что для ее детекции чувствительности Нозерн-блоттинга оказывается недостаточно.

9.2. Зонд

Для оценки специфичности зонда лучше всего использовать Нозерн-блот-гибридизацию, при которой зонд должен гибридизоваться со специфической мРНК, содержащей комплементарную нуклеотидную последовательность. Кроме того, при Нозерн-блоттинге можно точно определить температуру плавления гибрида мРНК/зонд. Зная эту температуру, можно выбрать степень жесткости условий гибридизации, необходимую при последующих экспериментах со срезами.

9.3. Специфичность гибридизации

Контроль специфичности гибридизации гарантирует, что наблюдаемый радиоавтографический сигнал появляется в результате специфического взаимодействия нуклеиновых кислот. К числу неспецифических взаимодействий относятся краевые эффекты и прилипание зонда к определенным типам тканей, а к числу слабоспецифических — связывание зонда с рибосомной РНК и с родственными мишени последовательностями. Вклад этих взаимодействий в суммарный гибридизационный сигнал можно оценить, проведя гибридизацию дополнительных срезов ткани с неродственными зондами или со смысловыми зондами (см. также гл. 4, 5 и 8).

Специфичность гибридизации можно оценить, зная предполагаемую температуру плавления гибридов между зондом и мишенью. Специфический сигнал не будет изменяться при повышении жесткости условий гибридизации, тогда как при неспецифическом или слабом связывании при повышении температуры гибриды будут диссоциировать.

Убедиться в том, что гибридизационный сигнал связан со специфическим взаимодействием зонда и РНК, позволяет предварительная обработка срезов РНКазой. Полное исчезновение сигнала при такой обработке указывает на то, что зонд связывается только с расщепляемыми РНКазой нуклеиновыми кислотами. Для проведения такого контроля срезы перед предгибридизацией в течение 30 мин обрабатывают РНКазой (20 мкг/мл), а затем проводят гибридизацию, как это описано в протоколе 7.4.

9.4. Гистологический контроль

Этот контроль является наименее количественным и наиболее важным. При ГИС необходимо быть уверенным в том, что радиоавтографический сигнал соответствует известным анатомическим структурам. При этом сигналы в клетках определенного типа должны отражать распределение этих клеток в ткани, а соседние, гистологически отличающиеся клетки по возможности вообще не должны давать гибридационный сигнал.

Комбинирование гибридизации *in situ* с другими методами позволяет расширить возможности контроля специфичности гибридизации. Имея серийные срезы, можно использовать гистохимические методы, например окрашивание иммунопероксидазой.

10. Количественные определения

В этом случае приходится тщательно контролировать множество разных параметров [10]: толщину срезов, сохранность нуклеиновых кислот, постоянство условий гибридизации и проявления, толщину и однородность эмульсии, доступность стандартных тканей, возможность построения стандартных кривых. Однако в любом случае «количественная» ГИС на самом деле может быть только полуколичественным методом.

11. Интерпретация данных

Интерпретация данных, полученных при ГИС, представляет собой весьма непростую задачу. В первую очередь нужно убедиться в специфичности наблюдаемого радиоавтографического сигнала. Например, некоторые связанные с воспалительными процессами клетки (эозинофилы, макрофаги) неспецифически связывают зонды (в первую очередь — меченные ^{35}S) [11]. Особенно осторожно следует подходить к интерпретации радиоавтографических сигналов, расположенных на краю среза. Необходимо учитывать возможность образования неполностью комплементарных дуплексов с негомологичными нуклеиновыми кислотами, электростатическое взаимодействие зонда с заряженными группами, застревание зонда в трехмерной структуре среза. Для адекватной интерпретации данных необходим хороший микроскоп, позволяющий проводить темнопольную и фазовоконтрастную микроскопию. Каждый эксперимент по изотопной ГИС должен сопровождаться положительными и отрицательными контролями. Отсутствие гибридационного сигнала при радиоавтографии

не обязательно говорит о том, что в анализируемом образце вообще нет искомой мРНК и соответствующего белка — просто число копий мРНК может быть очень мало и чувствительности метода недостаточно для ее обнаружения. Кроме того, при ГИС определяется конститутивный уровень гибридизующейся с зондом специфической мРНК, а при иммуноцитохимии — иммуно-реактивные белки. И хотя уровень экспрессии большинства генов регулируется содержанием соответствующей РНК, надо с осторожностью подходить к результатам экспериментов с «двойным окрашиванием» (например, при оценке секреторной активности), поскольку количество и тип детектируемых продуктов экспрессии генов зависит также от ряда других факторов, действующих на посттранскрипционном и посттрансляционном уровнях.

12. Требования к безопасности экспериментов по гибридизации *in situ* с применением радиоактивных изотопов

В экспериментах по ГИС чаще всего используют изотопы, испускающие β -частицы (см. табл. 7.1). При работе с ними необходимо соблюдать два основных требования. Следует исключить, во-первых, прямой контакт с изотопом — источником β -частиц (особенно при работе с ^{32}P), а во-вторых, распыление радиоактивного материала (образование аэрозолей). Кроме того, помещения, предназначенные для работы с изотопами, должны быть соответствующим образом оборудованы; необходимо обеспечить радиационный контроль, обучить персонал.

13. Некоторые примеры ГИС с мРНК в клинических препаратах с использованием изотопно меченных кРНК-зондов

При ГИС можно использовать биоптаты, полученные при хирургических операциях и эндоскопических исследованиях, аутопсийный материал, цитологические препараты (например, приготовленные из бронхоальвеолярных смывов), тканевые культуры.

13.1. Биоптаты, полученные при хирургических операциях

Биоптаты, получаемые при хирургических операциях, очень удобны тем, что в этом случае можно взять образец ткани непосредственно из интересующей исследователя области. Образец

необходимо как можно быстрее (в пределах 30 мин после иссечения) зафиксировать. На рис. 7.3 приведен пример изотопной гибридизации с мРНК, присутствующей в удаленной при хирургической операции опухоли. Выявление мРНК в опухолевой ткани очень важно, особенно при отсутствии иммунореактивности у изучаемого белка [12, 13].

13.2. Эндоскопические биоптаты

Гибридизацию с мРНК можно с успехом проводить и на небольших эндоскопических биоптатах. При биопсии необходимо предпринимать специальные меры для сохранения морфологии биоптатов и предотвращения краевых артефактов, часто возникающих при работе с раздавленными эндоскопическими биоптатами. Рис. 7.4 иллюстрирует гибридизацию ^{32}P -кРНК-зонда с мРНК в биоптате, полученном при эндоскопии бронхов [14].

13.3. Цитологические препараты

К числу таких препаратов относятся мазки шейки матки, бронхоальвеолярные смывы, пунктаты. Клетки можно фиксировать как в растворе, так и после их адгезии на предметном стекле (гл. 9). В случае цитологических препаратов обычно наблюдаются меньшая фоновая гибридизация и неспецифическое связывание метки [15]. Рис. 7.5 иллюстрирует гибридизацию ^{35}S -зонда с мРНК, содержащейся в бронхоальвеолярном смыве.

13.4. Аутопсийный материал

Некоторые ткани человека могут быть получены только при аутопсии. К сожалению, такие ткани утрачивают большую часть мРНК, особенно если аутопсия делается более чем через 25 ч после смерти [16]. Это необходимо учитывать при интерпретации результатов.

13.5. Культуры тканей

Культуры тканей — очень хорошая модельная система при проведении гибридизации с мРНК. В них содержится минимальное количество посторонних клеток и полностью отсутствуют эндогенные белки, что существенно облегчает локализацию мРНК в определенных типах клеточной популяции [5, 15].

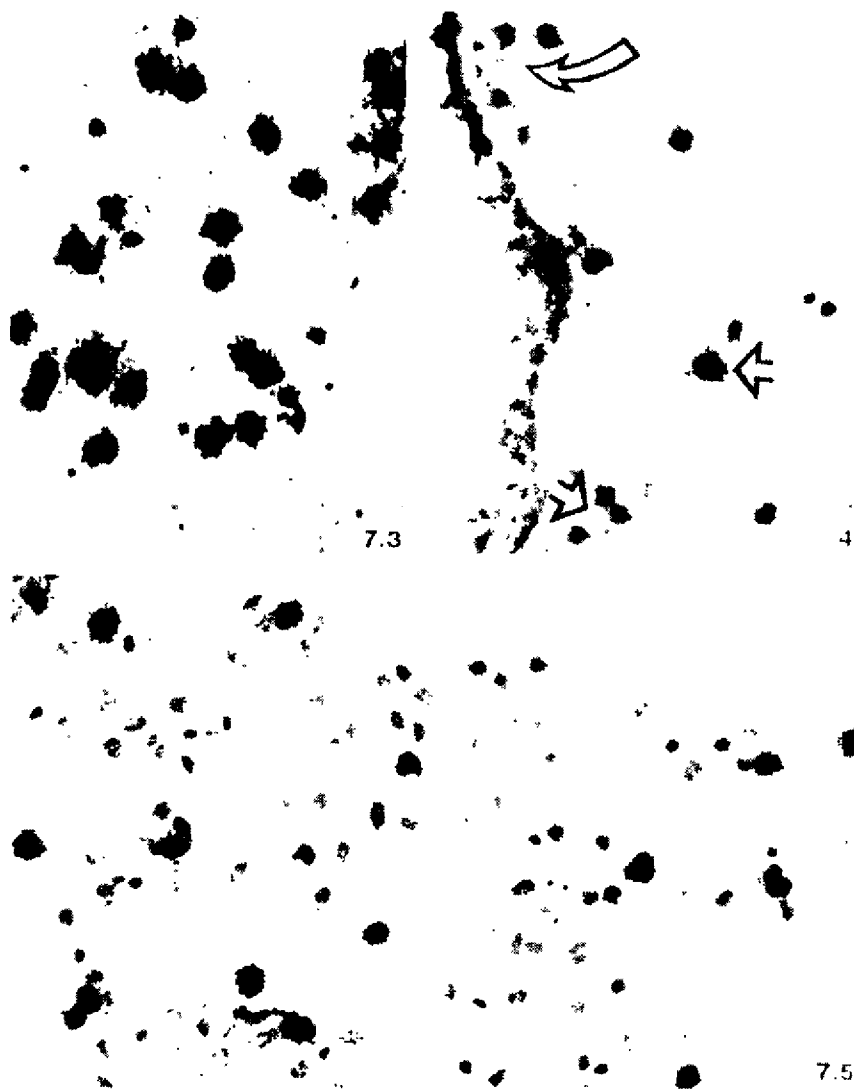


Рис. 7.3. Гибридизация *in situ* ^{32}P -зонда с мРНК хромогранина А в препарате, полученном при удалении мелкоклеточной карциномы легких.

Рис. 7.4. Радиоавтограф криостатного среза, полученного из эндоскопического биоптата бронха у больного астмой. Гибридизация *in situ* с IL-5-кРНК-зондом, меченным ^{32}P .

Рис. 7.5. Локализация мРНК колоний-стимулирующего фактора гранулоцитов и макрофагов (GM-CSF) в бронхоальвеолярном смыве у больного астмой. Гибридизация *in situ* с ^{35}S -кРНК-зондом.

Изотопная ГИС еще не стала рутинным методом исследований, но ее применение уже позволило глубже понять биологию и функциональную морфологию ряда заболеваний. Очень велики возможности метода ГИС при уточнении диагноза, поставленного на основании гистологических данных, а также при наблюдении за течением заболевания и результативностью терапии.

Литература

1. *Pardue M. L., Gall J. G.* (1969). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **64**, 600.
2. *Cox K. H., DeLeon D. V., Angerer L. M., Angerer R. C.* (1984). *Devel. Biol.*, **101**, 485.
3. *Hofler H., Childer H., Montminy M. R., Lachan R. M., Goodman R. H., Wolfe H. J.* (1986). *Histochem. J.*, **18**, 597.
4. *Hofler H.* (1987). *Pathol. Res. Pract.*, **182**, 421.
5. *Hamid Q. A., Wharton J., Terengi G., Hassall C., Aimi I., Taylor K., Nakazato H., Dixon J., Burnstock G., Polak J. M.* (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 6760.
6. *Brady M. A., Finlan M. F.* (1990). In: *In situ hybridization: principles and practice* (ed. J. M. Polak, J. O'D. McGee), pp. 31–57. Oxford University Press, Oxford.
7. *Roger A. W.* (1979). In: *Techniques in autoradiography*. Elsevier North-Holland, Amsterdam.
8. *Hofler H., Ruhri C., Putz B., Wirnberger G., Klimpfinger M., Smolle J.* (1987). *Virchows. Arch. B.*, **53**, 144.
9. *Chan-Paly V., Yasargil G., Hamid J. M., Polak J. M., Paly S. L.* (1988). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3212.
10. *Davenport A. P., Nunez D. J.* (1990). In: *In situ hybridization: principles and practice* (ed. J. M. Polak, J. O'D. McGee). Oxford University Press, Oxford.
11. *Kay A. B., Ying S., Varney V., Moqbel R., Wardlaw A., Durham S., Hamid Q. A.* (1991). *J. Exp. Med.*, **173**, 775.
12. *Hamid Q. A., Corrin B., Hofler H., Dewar A., Sheppard M.* (1990). *J. Pathol.*, **161**, 145.
13. *Hamid Q. A., Corrin B., Sheppard M., Polak J. M.* (1991). *J. Pathol.*, **163**, 293.
14. *Hamid Q. A., Azzawi M., Jeffery P., Kay A. B.* (1991). *J. Clin. Invest.*, **87**, 1541.
15. *Adams C., Hamid Q. A., Polak J. M.* (1990). In: *Methods in molecular biology* (ed. J. W. Pollard, J. M. Walker), p. 501. Humana Press, New Jersey.
16. *Gibson S. J., Polak J. M., Giaid A., Hamid Q. A., Kar S., Jones P. et al.* (1988). *Neurosci. Lett.*, **91**, 283.

ВЫЯВЛЕНИЕ мРНК В КЛИНИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТАХ С ПОМОЩЬЮ НЕИЗОТОПНОЙ ГИБРИДИЗАЦИИ IN SITU

*Эрик Яп, Хуан-Карлос Мартинес-Монтеро,
Джеймс О'Д. Макги*

1. Введение

Информационная (матричная) РНК (мРНК) служит посредником при переносе генетической информации от геномной ДНК к функционально активному полипептиду. Регуляция экспрессии генов в клетке путем активации и инактивации транскрипции осуществляется с помощью специфических сигналов и белков. Метод неизотопной гибридизации *in situ* (НГИС) позволяет выявить и точно локализовать в клетках или срезах тканей нуклеиновые кислоты с определенной последовательностью (см. обзоры [1—4]), а также провести полуколичественный анализ РНК-транскриптов одновременно с определением морфологического, биохимического и иммунологического фенотипов клеточного окружения. В результате удастся получить ценную информацию о пространственном распределении мРНК на тканевом, клеточном и субклеточном уровнях и проследить за изменением ее содержания при различных патологических состояниях и в процессе развития организма. При наличии аллель-специфичных зондов можно также провести качественный анализ распределения в клетках высокомолекулярных мРНК.

Пока метод НГИС используется в основном в чисто научных целях, однако с повышением доступности специфических зондов и автоматизацией процедур масштабы его применения в обычных диагностических лабораториях в диагностических и прогностических целях будут расширяться. Недавно разработанные методы выявления мРНК в фиксированных формалином и залитых в парафин архивных препаратах позволяют устанавливать корреляцию между экспрессией индивидуальных генов и развитием клинической картины заболевания, а также проводить ретроспективные исследования архивных препаратов.

1.1. Клеточные линии как модельные системы

Для внедрения любого нового метода в клиническую практику необходимо провести предварительные эксперименты с использованием модельных и контрольных систем. Очень удобными системами такого рода являются клеточные линии [5]. Они обладают следующими преимуществами:

- клеточные линии обычно хорошо охарактеризованы и число копий специфических мРНК в клетке либо точно известно, либо может быть определено с помощью Нозерн-блоттинга;
- экспрессию мРНК легко индуцировать или подавить с помощью различных физических воздействий, гормонов, факторов роста;
- клеточные линии достаточно (хотя и не полностью) однородны по составу;
- они являются неограниченным источником материала со стабильными свойствами.

Клеточные линии используются:

- а) как модели при разработке методики эксперимента: на них до начала работы с клиническими препаратами можно подобрать оптимальные условия для НГИС;
- б) для оценки чувствительности НГИС; при этом абсолютное количество РНК определяют с помощью Нозерн- или дот-гибридизации;
- в) как положительный контроль, который гарантирует, что метод НГИС «работает» стабильно, а не от случая к случаю, и позволяет добиться необходимой чувствительности;
- г) как отрицательный контроль: использование не экспрессирующей определенный ген клеточной линии позволяет убедиться в специфичности зонда.

Препарат культивируемых клеток обрабатывают так же, как клинические препараты тканей. Например, при сравнении с архивными препаратами клетки фиксируют, заливают в парафин и получают срезы. Однако вследствие различий между тканями разных типов и межклеточным материалом получить идентичные условия демаскирования и протеолитической обработки срезов не удастся, так что переносить результаты, полученные на клеточных культурах, на ткани (или результаты, полученные на одной ткани, на другую ткань) следует с осторожностью.

1.2. Контроли

Для правильной интерпретации результатов НГИС необходимо использовать соответствующие контроли, поскольку специфический гибридизационный сигнал легко перепутать с неспецифическим, обусловленным связыванием зонда с негомологичными ДНК и РНК, а также с другими клеточными и внеклеточными компонентами.

1.2.1. Отрицательные контроли

К числу отрицательных контролей для проверки специфичности зонда относятся:

- исключение зонда из раствора для гибридизации;
- использование неспецифических зондов (в идеале имеющих такие же GC-содержание, размер и уровень мечения), например,
 - а) смысловых РНК-зондов, если только не анализируются гены, которые транскрибируются в обоих направлениях (типа *c-myc*) [6];
 - б) прокариотических последовательностей (например, плазмидных векторов);
 - в) генов, экспрессирующихся только в специфических клетках (например, глобиновых генов);
- обработка срезов перед гибридизацией РНКазой (которая должна приводить к исчезновению сигнала) и ДНКазой (которая не должна влиять на РНК-специфический сигнал).

Мы используем в качестве отрицательных контролей гибридизацию без зонда, обработку нуклеазами и гибридизацию со смысловыми РНК-зондами.

1.2.2. Положительные контроли

Положительные контроли позволяют исключить получение ложноотрицательных результатов, которые могут возникать по техническим причинам или вследствие низкой чувствительности метода. В число таких контролей входят:

- линии клеток, в которых исследуемый ген экспрессируется с образованием необходимого числа копий;
- зонды для конститутивно экспрессирующихся генов, таких как гены актина и тубулина;
- образцы тканей, для которых ранее при гибридизации был получен положительный сигнал.

Мы используем в качестве положительного контроля биоптаты, для которых ранее был получен положительный сигнал.

1.2.3. Первые оценки специфичности зонда

Для первых оценок специфичности зонда можно использовать следующие процедуры (при повседневной работе их можно опустить):

- применение нескольких зондов, комплементарных неперекрывающимся участкам последовательности-мишени;
- конкурентное ингибирование при добавлении немеченого зонда;
- ступенчатое увеличение жесткости условий гибридизации или условий отмывания после гибридизации и определение температуры плавления гибридов зонд—мишень;
- сопоставление локализации гибридизационного сигнала с положением белка, известным из анатомических или иммуноцитохимических данных (впрочем, корреляция между расположением белка и соответствующей мРНК наблюдается не всегда).

2. Получение образцов тканей и подготовка их к гибридизации

2.1. Предупреждение загрязнения РНКазами

На коже человека всегда есть рибонуклеазы, инактивировать которые достаточно сложно. Эти ферменты не разрушаются при автоклавировании, поэтому, готовя реактивы и образцы тканей, необходимо предпринимать специальные меры, чтобы в них не попали РНКазы. Все работы следует проводить в перчатках, которые надо регулярно менять. Если это возможно, лучше использовать одноразовую стерильную, свободную от РНКаз пластиковую посуду. Стеклоянную посуду для инактивации РНКаз необходимо промыть этанолом и пероксидом водорода (H_2O_2) (протокол 8.1). Если вы работаете в перчатках, то стеклянные предметные стекла можно не подвергать какой-то специальной обработке. При всех манипуляциях с РНК необходимо использовать отдельные реактивы, а все растворы должны быть обработаны ДЭПК или приготовлены на ДЭПК-воде. Все эти меры предосторожности особенно важны при освоении нового метода и с накоплением опыта соответствующие протоколы могут быть упрощены. Мы считаем, что при проведении РНК-ГИС на залитых в парафин архивных

тканях (обращение с которыми и фиксация были далеко не идеальными) необходимо использовать только обработанную ДЭПК воду [7].

Протокол 8.1. Обработка стеклянной посуды для ингибирования РНКаз

1. Ополаскивают посуду 95% этанолом.
 2. Промывают в течение 10 мин 3% (о/о) пероскидом водорода.
 3. Ополаскивают в обработанной ДЭПК (см. протокол 8.2) воде.
 4. Высушивают в сушильном шкафу, предназначенном только для работы с РНК.
 5. Хранят посуду в защищенном от пыли месте, не допуская ее контакта с другими материалами.
-

Протокол 8.2. Подготовка обработанных ДЭПК¹⁾ воды и растворов реактивов²⁾

1. В вытяжном шкафу в дистиллированную воду или растворы добавляют ДЭПК (Sigma, UK) до конечной концентрации 0,1%.
 2. Тщательно перемешивают для полного растворения ДЭПК.
 3. Оставляют воду или растворы на ночь.
 4. Для стерилизации и удаления ДЭПК автоклавируют растворы или воду в течение 10 мин.
-

¹⁾ Возможно, ДЭПК является канцерогеном.

²⁾ Трис и другие содержащие аминогруппу соединения химически взаимодействуют с ДЭПК, поэтому для приготовления их растворов следует использовать воду, уже обработанную ДЭПК.

2.2. Образцы

Предварительная обработка вымытых стекол поли-L-лизином или аминоалкилсиланами, прогревание на предметных стеклах парафинированных срезов улучшает прилипание к ним клеток и срезов тканей и предотвращает потерю материала во время гибридизации и отмывания. Обработка предметных стекол органосиланами и получение срезов описаны в гл. 4; эти методы эффективны и в данном случае. Для гибридизации можно использовать разные образцы: клеточные культуры; клетки, содержащиеся в смывах и аспиратах; клетки, полученные при механическом разрушении ткани; криостатные и парафиновые срезы. На стеклянные пред-

метные стекла клетки наносят с помощью мазков или центрифугирования (см. гл. 5 и 9) либо наращивают их на стеклах в виде монослоя (протокол 8.3).

2.3. Фиксация

Чтобы обеспечить максимальную сохранность и минимальную деградацию нуклеиновых кислот, анализируемые образцы необходимо быстро зафиксировать или заморозить. Если этого не сделать, происходит ослабление гибридизационного сигнала независимо от продолжительности фиксации. При ГИС можно использовать разные методы фиксации: фиксацию замороженных срезов, перфузионную и иммерсионную фиксацию, заливку в парафин.

Наилучшие результаты обычно дают фиксаторы на основе альдегидов, образующих ковалентные сшивки. Во многих случаях оптимальным является 4% забуференный параформальдегид: его можно использовать для перфузии экспериментальных животных, фиксации культивированных клеток, мазков, криостатных срезов (их погружают в фиксирующий раствор на 10 мин) и биоптатов (их фиксируют в течение 2 ч) (протокол 8.3). Можно применять и блоки тканей, фиксированные по общепринятой методике в 10% забуференном формалине. При слишком сильной фиксации иногда приходится проводить более интенсивную ферментативную обработку препарата, что может привести к нарушению морфологии ткани или отслаиванию среза. Фиксация и подготовка к ГИС клеточных суспензий описаны в гл. 9.

Некоторые авторы рекомендуют использовать преципитирующие фиксаторы на основе спиртов (типа фиксатора Карнуа или метанола/уксусной кислоты), не образующие сшивок между нуклеиновыми кислотами и белками. Однако, как показывает наш опыт, при этом утрачивается слишком много мРНК и нарушается морфология клеток.

Протокол 8.3. Подготовка и фиксация препаратов монослойных клеточных культур, мазков и криостатных срезов

Материалы

- Раствор трипсин/ЭДТА (Gibco, UK)
- Многокомпонентная среда: среда RPMI 1640, содержащая 2 мМ L-глутамин (Gibco, UK), пенициллин/стрептомицин, 100 мкг/мл (Gibco, UK), 10% сыворотку плода коровы. Среда может храниться при 4 °C до 2 нед

- Стерильные, покрытые органосиланами предметные стекла с большим числом ячеек (см. гл. 4)
- Фосфатно-солевой буфер (ФСБ): 10 мМ Na_2HPO_4 , 150 мМ NaCl на обработанной ДЭПК воде, pH 7,2–7,4
- Забуференный 4% (в/о) параформальдегид: 4 г параформальдегида (BDH, UK) растворяют в нагретом до 90–100 °С ФСБ при аккуратном помешивании; всю процедуру проводят в вытяжном шкафу. Перед использованием раствор охлаждают во льду до температуры ниже 10 °С
- Глицин

Методика

1. Сливают среду и суспендируют клетки, залив их при 37 °С на 2 мин 5 мл раствора трипсин/ЭДТА (из расчета на сосуд для культивирования с площадью 80 см²).
2. Переливают суспензию в квадратную чашку Петри со стерильными, покрытыми органосилоном предметными стеклами с большим числом ячеек, разводят ее 10 мл свежеприготовленной многокомпонентной среды и помещают чашку на 37 °С для адгезии клеток на предметных стеклах.
3. После 4–12 ч инкубации проверяют качество адгезии, вынимают стекла из чашек Петри и промывают их в стерильном ФСБ.
4. Свежеприготовленные мазки, криостатные срезы толщиной 6–8 мкм и клетки после адгезии на предметных стеклах фиксируют в течение 10 мин в свежеприготовленном 4% параформальдегиде в ФСБ.
5. Погружают стекла в 0,2% (в/о) глицин в ФСБ на 5 мин и ополаскивают их в ФСБ.
6. Проводят демаскирование (см. протокол 8.4) или высушивают стекла при комнатной температуре и хранят их при –20 °С.

2.4. Демаскирование нуклеиновых кислот

Цель демаскирования — повысить проницаемость клеточных мембран и доступность мРНК-мишени для зонда при сохранении морфологии ткани, целостности среза и минимальных потерях РНК. Этот этап очень важен для получения хороших результатов гибридизации, так что концентрацию демаскирующих агентов и время их действия необходимо подбирать опытным путем для каждой комбинации зонд/мишень (гл. 4). Оптимальные условия, обеспечивающие достижение столь разных целей, зависят от типа ткани, толщины среза, способа и продолжительности фиксации,

типа и размера зонда. Если препарат фиксируют с помощью агентов, образующих большое число ковалентных сшивок (типа глутаральдегида), то в дальнейшем необходимо провести интенсивное демаскирование, а после преципитирующей фиксации дополнительная протеолитическая обработка может вообще не потребоваться.

Чаще всего для демаскирования используют пепсин или протеиназу К. Мы считаем, что для архивных биоптатов (которые обычно фиксированы формалином и залиты в парафин) и препаратов таких тканей и органов, как желудок, лимфатические узлы, железы, мозг, оптимальной является инкубация в 0,1% (в/о) пепсине-HCl в течение 20 мин при 37 °C [8]. Но в случае тканей молочной железы такая обработка может приводить к излишнему демаскированию. Для обработки фиксированных параформальдегидом тканей мы обычно используем протеиназу К и после протеолитического демаскирования дополнительно фиксируем срезы в параформальдегиде для уменьшения потерь РНК. В протоколе 8.4 приведены практические рекомендации по проведению демаскирования, а описание других, альтернативных вариантов демаскирования можно найти в гл. 4, 6 и 9.

3. Гибридизация *in situ*

3.1. Зонды

В опытах по гибридизации *in situ* с мРНК применяют зонды нескольких типов.

- а. Двухцепочечные кДНК или геномные ДНК: их можно использовать при гибридизации как с ДНК, так и с РНК. Зонды этого типа образуют сети с молекулами-мишенями, что в принципе должно приводить к усилению гибридизационного сигнала, однако на практике в результате ассоциации в растворе такие зонды плохо проникают в ткань и лишь малая их часть гибридизуется с мРНК-мишенью. Для мечения двухцепочечных ДНК-зондов используют методы никотрансляции (гл. 4 и 5), рассеянной затравки (гл. 13) и полимеразную цепную реакцию (гл. 5, 13).
- б. Одноцепочечные ДНК: эти зонды, как и любые другие одноцепочечные молекулы, гибридизуются только с одной цепью молекулы-мишени, так что комплементарная цепь может служить идеальным отрицательным контролем (она имеет те же GC-содержание и длину).

- в. Синтетические олигонуклеотидные зонды: очень ценны для дифференциального выявления высокомолекулярных последовательностей или в тех случаях, когда кДНК не клонирована или полностью не секвенирована. Такие зонды легче других проникают в ткань, но их не удастся пометить до достаточно высокого уровня. Чтобы компенсировать низкий уровень мечения, часто используют смеси из большого числа (до 15) олигонуклеотидов. Методы мечения олигонуклеотидных зондов описаны в гл. 13.
- г. Комплементарные одноцепочечные антисмысловые РНК-зонды (рибо-зонды): они считаются наиболее удобными при ГИС с мРНК. Их можно пометить до высокого уровня, они образуют с РНК комплексы с высокой T_m , не содержат векторных последовательностей, которые могли бы гибридизоваться с клеточными нуклеиновыми кислотами. Однако по сравнению с ДНК-зондами рибо-зонды дают более высокий неспецифический фон, который, впрочем, можно существенно снизить, обработав препарат после гибридизации РНКазой, гидролизующей несвязавшийся (одноцепочечный) РНК-зонд. Для мечения рибо-зондов биотином или дигоксигенином используется метод транскрипции *in vitro* (гл. 5, 13).

Как показывает наш опыт, для неизотопной ГИС с мРНК, содержащейся в архивных препаратах, наиболее приемлемыми зондами являются РНК и олигонуклеотиды. Методика работы с ними описана в протоколе 8.4.

3.1.2. Выбор неизотопной метки

В последние годы в опытах по гибридизации *in situ* все чаще используются неизотопные метки, которые обеспечивают такую же чувствительность, как изотопные, но при этом более доступны, безопасны для персонала и окружающей среды, проще в работе. Неизотопными молекулами-свидетелями могут быть самые разные соединения. Очень широко (за исключением анализа тканей с высоким уровнем эндогенного биотина, например печени и почек) используется биотин, который связывается с высоким сродством с авидином и стрептавидином. Часто предпочтение отдается растительному алкалоиду дигоксигенину, детектируемому при помощи моноклональных антител; он обеспечивает по крайней мере такую же чувствительность, как и биотин, при низком уровне неспецифического связывания и подходящих химических свойствах (гл. 9). Протоколы, приведенные в этой главе, можно использовать для работы с зондами, меченными как биотином, так и дигоксигенином.

3.2. Предгибридизация

Обычно процедура ГИС включает стадию предгибридизации, цель которой состоит в снижении уровня неспецифического связывания зонда с клеточными структурами путем блокирования возможных мест связывания. Как нам представляется, предгибридизацию имеет смысл проводить в случае неизотопной ГИС при анализе срезов залитых в парафин тканей, только когда в качестве зондов используются олигонуклеотиды, но не РНК (J. Burns, J.-C. Martinez-Montero, J. O'D. McGee, не опубликовано). Предгибридизацию проводят в гибридизационной смеси, содержащей блокирующие вещества (РНК дрожжей, поливинилпирролидон, ДНК спермы лосося, тритон), но не содержащей зонда.

3.3. Денатурация

Может показаться, что денатурация нужна только при работе с двухцепочечными ДНК-зондами, и часто эта процедура действительно отсутствует в стандартных протоколах неизотопной ГИС с РНК-зондами. Однако наш опыт показывает, что одновременное прогревание в течение 15 мин при 95 °С одноцепочечного рибозонда и тканевого среза существенно увеличивает чувствительность метода НГИС при выявлении мРНК лизоцима в архивных биоптатах желудка [7]. В результате такой обработки достаточно сильный сигнал появляется уже после непродолжительной (2 ч) гибридизации, тогда как без прогревания он становится заметен только при инкубации в течение ночи. Возможно, тепловая обработка повышает проницаемость клеточных структур и разрушает вторичную структуру мРНК и рибо-зонда.

3.4. Гибридизация

Чтобы осуществить гибридизацию зонда с мРНК ткани, срезы под покровными стеклами инкубируют в течение 2–16 ч в смеси для гибридизации. В состав этой смеси входят зонд, используемые при предгибридизации блокирующие вещества, ингибиторы РНКаз, формамид и соли. Скорость отжига и термостабильность (T_m) дуплексов мРНК—зонд зависят от температуры гибридизации, концентрации солей и формамида, и при высокой температуре, большом содержании формамида и низкой концентрации солей в гибридизационной смеси (гибридизация в жестких условиях) образуются только высокомолекулярные дуплексы (гл. 4). Степень жесткости определяется требуемым уровнем гомологии

между мРНК и зондом, типом и размером зонда, GC-содержанием в случае коротких зондов. Дуплексы РНК–РНК более стабильны, чем дуплексы, содержащие ДНК, поэтому гибридизацию с кРНК-зондами проводят при температуре, на 10–15 °С превышающей ту, при которой работают с ДНК-зондами.

Еще две изменяющиеся величины, важные для гибридизации, — размер зонда и его концентрация. Размер зонда, оптимальный для диффузии и проникновения в ткань, может в разных случаях различаться, но зонды размером более 1 т.н. можно гидролизовать щелочью. Мы считаем, что лучшие результаты при гибридизации получаются с полноразмерными (длиной примерно 600 нуклеотидов) транскриптами, а не с короткими, полученными при гидролизе фрагментами [7]. Оптимальной является такая концентрация зонда, при которой происходит насыщение всех сайтов связывания в мишени и достигается максимальное отношение сигнал/шум (фон возрастает пропорционально концентрации зонда). Для экономии зонда в гибридизационную смесь иногда добавляют полимер декстрансульфат, увеличивающий за счет эффекта исключенного объема эффективную концентрацию зонда.

3.5. Отмывание после гибридизации

Отмывание препарата после гибридизации в условиях повышенной жесткости приводит к диссоциации несовершенных гибридов, и в идеале после этой процедуры зонд должен быть связан только с комплементарными последовательностями нуклеиновой кислоты-мишени. Если гибридизация проводится в мягких условиях, способствующих неспецифическому связыванию зонда, то отмывание следует проводить в жестких условиях, и в большинстве из описанных протоколов используется именно этот подход. При проведении же самой гибридизации в достаточно жестких условиях отмывание при повышенной жесткости не обязательно. По нашим данным, длительное отмывание препаратов в $2 \times \text{SSC}$ (1 ч при 20 °С) с последующим отмыванием в жестких условиях ($0,2 \times \text{SSC}$ в 50% формамиде при 50 °С в течение 30 мин) не приводит к снижению фона по сравнению с отмыванием в $2 \times \text{SSC}$ дважды по 5 мин при комнатной температуре [7].

РНК-зонды особенно склонны к неспецифическому связыванию. Возникающий при этом фон можно существенно снизить обработкой РНКазой, специфически расщепляющей негибризовавшуюся одноцепочечную РНК, но не гибриды РНК–РНК.

3.6. Детекция

Для визуализации неизотопно меченных зондов применяют несколько систем детекции. Мы предпочитаем использовать для работы с мечеными биотином и дигоксигенином зондами два из них. Более чувствителен непрямой метод с использованием трех антител, конъюгированных с щелочной фосфатазой—НСТ/БХИФ (рис. 8.1), но он — особенно в случае биотинилированных зондов — дает более высокий фон. Тем не менее мы рекомендуем сначала попробовать этот метод и только затем для снижения фона прибегать к менее чувствительному прямому (одно антитело) методу. Кроме того, можно заменить НСТ/БХИФ на краситель быстрый красный, который, впрочем, обеспечивает меньшую чувствительность.

Полное описание неизотопной ГИС — от депарафинирования срезов до детекции зонда — дано в протоколе 8.4.



Рис. 8.1. Гибридизационный сигнал, выявленный в цитоплазме клеток Панета методом гибридизации *in situ* меченного дигоксигенином РНК-зонда с лизоцимной мРНК в фиксированных формалином парафиновых срезах двенадцатиперстной кишки.

Протокол 8.4. Обнаружение специфических мРНК при помощи неизотопной гибридизации in situ

Материалы

- Обработанная ДЭПК ультрачистая или бидистиллированная вода (см. протокол 8.2)
- Раствор пепсин-HCl: 0,1 г пепсина (P7000, Sigma) растворяют в 96 мл нагретой до 37 °С воды и добавляют 4 мл 5 М HCl до конечной концентрации 0,2 М
- ФСБ (см. протокол 8.3)
- Свежеприготовленный 4% параформальдегид (см. протокол 8.3)
- Глицин
- Протеиназа К (Boehringer Mannheim)
- Раствор РНКазы А: 150 мкг/мл свободной от ДНКаз РНКазы А (Boehringer Mannheim) в 2 × SSC
- Раствор ДНКазы I: 200 мкг/мл свободной от РНКаз ДНКазы I (Boehringer Mannheim) в 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 10 мМ MgCl₂
- 20 × SSC: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0
- Буфер ТЭ: 10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА
- Гибридизационный буфер (ГБ)¹⁾: 5 мл деионизованного формамида, 1 мл 50% декстрансульфата, 1 мл 20 × SSC (более подробно приготовление буфера описано в гл. 4)
- Гибридизационная смесь (ГС): 7 мкл БГ, 2 мкл буфера ТЭ, 1 мкл меченого зонда (рибо- или олиго-) в соответствующем разведении¹⁾
- Трис-солевой буфер (ТСБ): 50 мМ трис-HCl, pH 7,2, 100 мМ NaCl
- Блокирующий раствор (ТБТ): ТСБ, содержащий 3% (в/о) БСА, 0,05% (о/о) тритон X-100
- Моноклональные антитела к дигоксигенину (Sigma, UK)
- Биотинилированные кроличьи антитела к иммуноглобулинам мыши [фрагмент F(ab)₂] (например, Dakopatts, UK)
- Конъюгированная со стрептавидином щелочная фосфатаза (например, Dakopatts, BK)
- Сухое обезжиренное молоко (например, Marvel, Cadburys)
- Субстрат НСТ/БХИФ (см. гл. 4)

Методика

А. Депарафинирование (только для срезов залитых в парафин тканей)

1. Парафин расплавляют, прогревая срезы в течение 10 мин при 75 °С.

Протокол 8.4 (Продолжение)

2. Еще теплые срезы переносят в ксилол и промывают 2 раза по 5 мин.
3. Дважды по 5 мин промывают в метаноле.
4. Дважды быстро промывают срезы в обработанной ДЭПК воде и переходят к демаскированию.

Б. Демаскирование РНК

1. (а) Фиксированные формалином срезы инкубируют 20 мин в водяной бане при 37 °С в сосуде Коплина в 0,1% пепсине-НСl.
(б) В случае свежefиксированных параформальдегидом препаратов нуклеиновые кислоты демаскируют обработкой в течение 15 мин при 37 °С протеиназой К (1 мкг/мл).
2. Дважды быстро промывают срезы в обработанной ДЭПК воде.
3. Проводят дополнительную фиксацию срезов в 4% (в/о) параформальдегиде в ФСБ в течение 5 мин при комнатной температуре.
4. Промывают срезы в 0,2% (в/о) глицине в ФСБ в течение 5 мин.
5. Используемые в качестве контроля препараты инкубируют с РНКазой или ДНКазой I в течение 30 мин при 37 °С.
6. Быстро ополаскивают срезы в ФСБ, обработанной ДЭПК воде и метаноле.
7. Высушивают срезы при 37 °С.

В. Гибридизация

1. Наносят на срез необходимое количество гибридизационной смеси²⁾. Срез накрывают покровным стеклом так, чтобы под стекло не попали пузырьки воздуха.
2. Прогревают срезы во влажной чашке Терасаки при 95 °С в течение 15 мин.
3. Проводят гибридизацию в выбранных (температура и время) условиях³⁾.

Г. Отмывание после гибридизации

1. Чтобы снять покровное стекло и удалить несвязавшийся зонд, промывают срез в течение 5 мин в 2 × SSC.
2. Если используются рибо-зонды, обрабатывают срезы в течение 30 мин при 37 °С РНКазой А.
3. Промывают в двух сменах 2 × SSC, по 5 мин в каждой, при комнатной температуре.

Д. Детекция

1. Промывают срезы в течение 10 мин в блокирующем растворе (ТБТ).

2. Инкубируют в течение 30 мин во влажной камере с разведенными в ТБТ в соотношении 1:10 000 антителами к дигоксигенину.
3. Промывают в ТСБ.
4. Инкубируют в течение 20 мин с разведенным в ТБТ в соотношении 1:200 биотинилированным $F(ab)_2$ -фрагментом кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши.
5. Промывают в ТСБ.
6. Инкубируют в течение 20 мин в конъюгате стрептавидина с щелочной фосфатазой, разведенном в соотношении 1:50 ТБТ, содержащем 3% (в/о) сухое обезжиренное молоко.
7. Промывают в ТСБ.
8. В темноте в течение 1 ч инкубируют с НСТ/БХИФ (через каждые 10–15 мин проверяя под микроскопом, как изменяется сигнал).
9. Промывают срезы в течение 5 мин в проточной воде.
10. Высушивают срезы при температуре 37–75 °С, окрашивают метиловым зеленым и монтируют с использованием глицеринового желе (гл. 4).

¹⁾ Все компоненты гибридизационной смеси готовят на обработанной ДЭПК воде (подробно приготовление гибридизационной смеси рассмотрено в гл. 4). Необходимую концентрацию зонда подбирают экспериментально; обычно она варьирует от 0,05 до 1 нг/мкл.

²⁾ Для большого среза (покровное стекло размером 22 × 22 мм) достаточно 20 мкл, а для небольших срезов (покровное стекло диаметром 14 мм) — 8 мкл.

³⁾ Температуру и время подбирают экспериментально. При этом температура варьирует между 50–60 °С для рибо-зондов и равна 37 °С для олиго-зондов, а время гибридизации лежит в диапазоне от 2 до 16 ч. Мы проводили гибридизацию лизоцимной мРНК в течение 2 ч при 50 °С [7].

4. Транскрипция *in situ*

Транскрипция *in situ* (ТИС) — сравнительно недавно разработанная модификация метода обычной гибридизации *in situ* [10]. Она включает ТИС мРНК со специфическими олигонуклеотидными праймерами и последующую обратную транскрипцию в присутствии меченых нуклеотидов с образованием *in situ* меченой кДНК (рис. 8.2). кДНК-транскрипт можно наблюдать визуально или элюировать для дальнейшего анализа с помощью блот-гибридизации [10] или амплификации [11].

Этот метод позволяет локализовать специфические мРНК [12] и особенно удобен в тех случаях, когда нуклеотидная после-

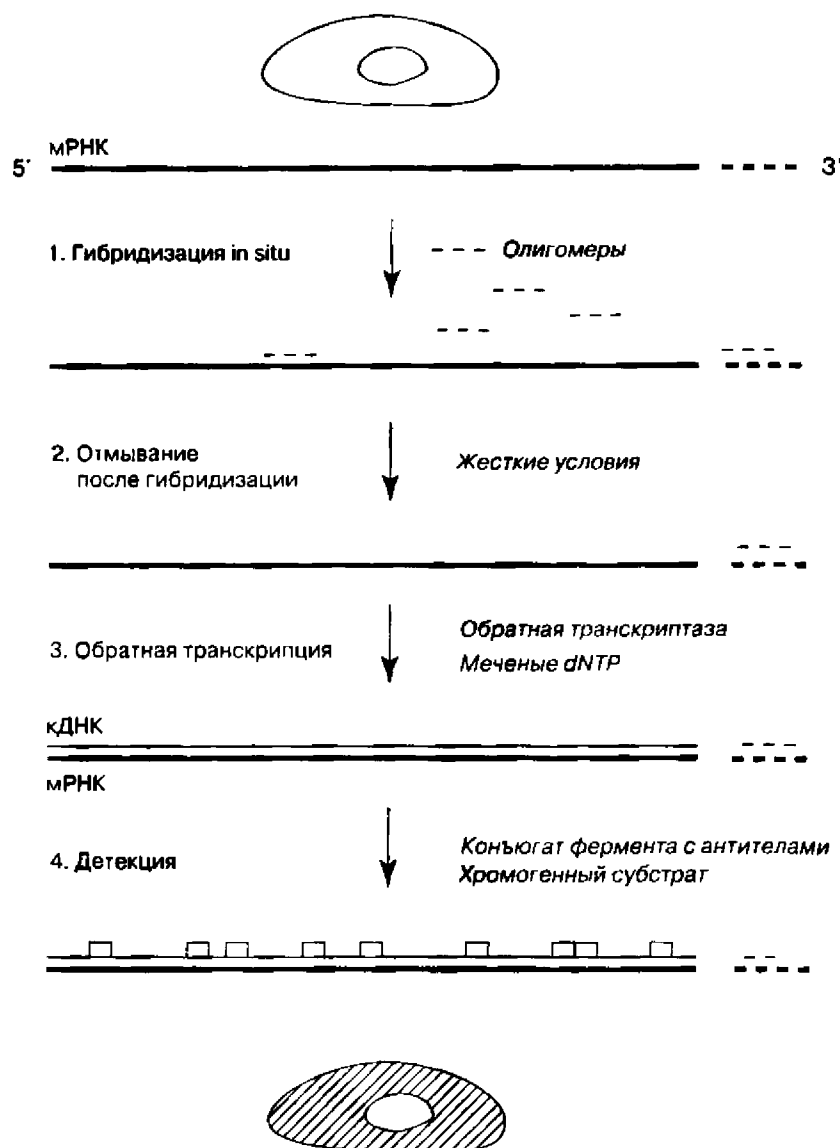


Рис. 8.2. Транскрипция in situ.



Рис. 8.3. Транскрипция *in situ* poly(A²⁺)-мРНК в линии клеток MCF-7. В качестве праймера использовался oligo(dT), а в качестве субстрата — дигоксигенин-меченные нуклеотиды. Как и следовало ожидать, гибридизационный сигнал локализуется преимущественно в цитоплазме.

довательность мРНК известна только частично или когда возможен альтернативный сплайсинг мРНК [13]. В принципе с помощью транскрипции *in situ* можно, используя короткие дискриминирующие праймеры, выявлять транскрипты мутантных аллелей одного гена и определять содержание мРНК в срезах ткани [14].

Нами разработана методика транскрипции *in situ* с использованием неизоотопно меченных нуклеотидов для выявления суммарной мРНК в MCF7-клетках при помощи oligo(dT)-праймеров. Оптимальные условия проведения такого анализа, подобранные эмпирически, представлены в протоколе 8.5 (Е. Р. Н. Yар, J. O'D. McGee, неопубликованные данные).

При работе с культурами клеток для фиксации лучше использовать параформальдегид, а не метанол/уксусную кислоту. Включение процедуры тепловой денатурации, эффективной при ГИС с рибо-зондами, приводит к резкому усилению фона, даже когда гибридизацию осуществляют при 50 °С. Это связано с тем, что при нагревании происходит денатурация ядерной ДНК и усили-

вается неспецифическое связывание праймера и неспецифический синтез меченых продуктов при транскрипции. Мы также обнаружили, что при гибридизации в присутствии формамида нет необходимости в длительном отмывании препарата в жестких условиях. Для транскрипции *in situ* мы использовали олигомеры длиной более 25 нуклеотидов, а отрицательным контролем служила транскрипция в отсутствие праймера или в присутствии в качестве праймера *oligo(dA)* длиной менее 25 нуклеотидов. Оптимальные условия элонгации (концентрация фермента, состав буфера для обратной транскрипции, время инкубации, система детекции) зависят от источника обратной транскриптазы. При детекции наилучшие результаты были получены при использовании в качестве субстрата быстрого красного (рис. 8.3), но вполне пригодны также НСТ/БХИФ (прямая пероксидазная система) и 3-амино-9-этилкарбазол (АЭК) (непрямая пероксидазная система).

Протокол 8.5. Неизотопная транскрипция *in situ*

Материалы и исходные растворы

- Обработанная ДЭПК деионизованная вода (см. протокол 8.2)
- Олигомеры: *oligo(dT)*₂₅₋₃₀ и *oligo(dA)*₂₅₋₃₀ (Pharmacia, UK), растворенные в обработанной ДЭПК воде до концентрации 1,12 мкМ или 10 нг/мкл
- Деионизованный формамид (см. гл. 4)
- 20 × SSC (см. протокол 8.4)
- Гибридизационная смесь: 50% формамид, 4 × SSC, 2 нг/мкл олигомера
- 5 × буфер для обратной транскриптазы (5 × БОТ): 250 мМ трис-HCl, pH 8,3, 50 мМ MgCl₂, 250 мМ KCl
- 25 мМ дитиотрейтол
- Смесь нуклеотидов: dATP, dCTP, dGTP по 2,5 мМ
- 1 мМ ТТР
- 1 мМ dig-11-dUTP (Boehringer Mannheim)
- Ингибитор РНКаз (типа RNAgard фирмы Pharmacia, 35 ЕД/мкл)
- Обратная транскрипция вируса миелобластома птиц (Pharmacia), 18 ЕД/мкл
- ТСБ, pH 7,2 (см. протокол 8.4)
- Блокирующий раствор (ТБТ) (см. протокол 8.4)
- Щелочная фосфатаза, конъюгированная с антителами к дигоксигенину (Boehringer Mannheim)

- **Буфер для быстрого красного:** растворяют 2 мг нафтола AS-MX (Sigma N4875) в 0,2 мл диметилформамида и к полученному раствору добавляют 9,8 мл 0,1 М трис-HCl, pH 8,2. Добавляют 10 мкл 1 М левамизола, разливают на аликвоты и хранят до использования при -20°C .
- **Субстрат быстрый красный:** 1 мг быстрого красного TR (Sigma F1500) растворяют в 1 мл буфера для субстрата, фильтруют и используют сразу после приготовления.

Методика

Культивируемые клетки переносят на обработанные органо-носиланом предметные стекла с большим числом ячеек и фиксируют параформальдегидом, как описано в протоколе 8.3.

А. Гибридизация

1. В ячейки предметного стекла диаметром 12 мм вносят по 9 мкл гибридизационной смеси и накрывают покровным стеклом.
2. Инкубируют стекло во влажной камере при комнатной температуре в течение ночи (12–20 ч).

Б. Отмывание после гибридизации

1. Промывают предметные стекла в $2 \times \text{SSC}$, приготовленном на обработанной ДЭПК воде, два раза по 10 мин, при 20°C .
2. Промывают стекла 30 мин при 20°C в $0,5 \times \text{SSC}$.
3. Быстро (в течение 10–30 мин) при 20°C высушивают стекла.

В. Обратная транскрипция

1. Готовят транскрипционную смесь следующего состава.

• $5 \times \text{БОТ}$	20 мкл
• Смесь нуклеотидов	10 мкл
• ТТР	2,5 мкл
• Dig-dUTP	1 мкл
• ДТТ	4 мкл
• Ингибитор РНКаз	0,5 мкл
• Обратная транскриптаза	3 мкл
• Вода	до 100 мкл

2. В ячейки предметного стекла вносят по 9 мкл транскрипционной смеси и накрывают покровным стеклом.
3. Инкубируют во влажной камере (типа чашки Тerasaki) при 37°C в течение 15–30 мин (время инкубации подбирают опытным путем).

Протокол 8.5 (Продолжение)

Г. Отмывание после транскрипции и детекция

1. Промывают стекла в $2 \times \text{SSC}$ при 20°C , два раза по 10 мин.
 2. Промывают стекла в $0,5 \times \text{SSC}$ при 40°C , два раза по 15 мин.
 3. Промывают стекла в блокирующем растворе (ТБТ) в течение 10 мин.
 4. Инкубируют 30 мин во влажной камере с разведенными в ТБТ (1:200) конъюгированными с щелочной фосфатазой антителами к дигоксигенину.
 5. Дважды ополаскивают стекла в ТСБ.
 6. Инкубируют стекла в свежеприготовленном растворе субстрата быстрый красный в течение 10–20 мин при 20°C .
 7. Промывают стекла в проточной воде в течение 5 мин, высушивают при $37\text{--}75^\circ\text{C}$, окрашивают клетки гематоксилином и монтируют в глицериновом желе (см. гл. 2).
-

5. Заключение

Возможность выявления методом неизотопной ГИС транскриптов определенных генов и установления корреляции между этими транскриптами, белками, морфологией клеток и тканей позволяет изучать широкий спектр различных патологических процессов. Более того, ГИС — это наиболее чувствительный метод обнаружения РНК, экспрессирующейся в небольшом числе клеток в многокомпонентной клеточной популяции, и способ изучения нестабильных или быстро секретируемых белков.

Анализ различий в экспрессии генов в норме и патологии все шире используется для изучения регуляции экспрессии генов и ее роли в патогенезе различных заболеваний. Перечислим некоторые области применения этого подхода.

- а. Параллельная детекция специфических мРНК и соответствующих белков, позволяющая исследовать процессы дифференцировки клеток и тканей.
- б. Изучение экспрессии клеточных онкогенов, позволяющее раскрыть механизмы неопластической трансформации клеток, разработать новые способы диагностики и классификации предраковых состояний и их дифференциации от ранних неоплазий [16, 17], выявлять специфичные для разных типов опухолей маркеры, предсказывать клиническое течение и исход опухолевого процесса.

- в. Изучение активации генов множественной лекарственной устойчивости, позволяющее выработать более эффективную стратегию терапии.
- г. Исследование экспрессии цитокинов — белков межклеточной системы сигнализации — в норме и патологии.

Благодарности

Э. Я. является Родесовским стипендиантом. Работы Х.-К. М.-М. финансирует Fondo de Investigaciones Sanitarias (Spain), а работы Дж. О'Д. М. — Cancer Research Campaign (UK).

Литература

1. Warford A. (1988). *Med. Lab. Sci.*, **45**, 381.
2. Tecott L. H., Eberwine J. H., Barchas J. D., Valentino K. L. (1987). In: *In situ hybridization: Applications to neurobiology* (ed. K. L. Valentino, J. H. Eberwine and J. D. Barchas). Oxford University Press, Oxford.
3. Singer R. H., Lawrence J. B., Villnave C. (1986). *Bio Techniques*, **4**, 230.
4. Bresser J., Evinger-Hodges M. J. (1987). *Gene Anal. Techn.*, **4**, 89.
5. Naber S. P., Tsutsumi Y., Yin S., Zolnay S. A., Mobtaker H., Marks P. J., McKenzie S. J., DeLellis R. A., Wolfe H. J. (1990). *Am. J. Clin. Pathol.*, **94**, 125.
6. Kate J. P., Eidelman S., Bosman F., Damjanov I. (1989). *J. Histochem. Cytochem.*, **37**, 541.
7. Martinez-Montero J. C., Herrington C. S., Sawyer H., Stickland J., Evans M., Flannery D., McGee J. (1991). *J. Clin. Pathol.*, **44**, 835.
8. Burns J., Graham A. K., Frank C., Fleming K. A., Evans M. F., McGee J. (1988). *J. Clin. Pathol.*, **40**, 858.
9. Akhtar N., Ruprai A., Pringle J. H., Lauder I., Durrant S. T. (1989). *Br. J. Haematol.*, **73**, 296.
10. Tecott L. H., Barchas J. D., Eberwine, J. H. (1988). *Science*, **240**, 1661.
11. Van Gelder R. N., von Zastro M. E., Yool A., Dement W. C., Barchas J. D., Eberwine J. H. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 1663.
12. Moarla H., Mocharla R., Hodes M. E. (1990). *Nucleic Acids Res.*, **18**, 1031.
13. Longley J., Merchant M. A., Kacinski B. M. (1989). *J. Invest. Dermatol.*, **93**, 432.
14. Tecott L. H., Eberwine J. H. (1989). In: *Methods in neurosciences — Gene probes* (ed. M. Conn.). Academic Press, Orlando, Florida.
15. Lawrence D. C., Singer, R. L. (1986). *Cell*, **45**, 407.
16. DeLellis R. A., Wolfe H. (1987). *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **111**, 620.
17. Wolfe H. J. (1988). *Am. J. Clin. Pathol.*, **90**, 340.

ПРИМЕНЕНИЕ ГИБРИДИЗАЦИИ *IN SITU* ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ЦИТОПАТОЛОГИЙ

Саймон Херрингтон, Джеймс О'Д. Макги

1. Введение

Для обнаружения в цитологическом материале нуклеиновых кислот разработано множество разнообразных методов. Большинство из них предполагает выделение нуклеиновых кислот, а следовательно, разрушение клеток [1—6], и в последнее время все большее применение находят неdestructивные методы, прежде всего гибридизация *in situ*. В первую очередь это касается генетического материала вирусов [7]. Преимущество гибридизации *in situ* состоит в том, что специфические нуклеотидные последовательности можно локализовать микроскопическими методами непосредственно в клетке. Большинство имеющихся на сегодня данных получено на ДНК, поэтому мы остановимся на применении метода ГИС только к нуклеиновым кислотам этого типа. Методы обнаружения мРНК описаны в гл. 7.

Изотопная гибридизация *in situ* рассмотрена в гл. 7. Здесь речь пойдет о более подходящих для рутинной диагностики цитопатологий неизотопных методах.

2. Получение материала и подготовка препаратов

Цитологический материал можно получить и подготовить разными способами, при этом лучше по возможности не вносить в отработанную процедуру никаких изменений. Цитологические препараты бывают двух основных типов:

- нативные мазки;
- мазки, полученные методом капли или осаждением клеток на стекло центрифугированием клеточной суспензии.

Первый, наиболее распространенный способ не предусматривает никакой предварительной очистки препаратов. Это создает проблемы при анализе, например, аспиратов или выщелушивающихся клеток шейки матки, когда эпителиальные клетки перемешаны с клетками из очага воспаления, слизистым секретом и бактериями. Как правило, цитологического материала для анализа

бывает очень мало, поэтому препараты лучше всего готовить из клеточных суспензий с последующей их очисткой и нанесением на стекла центрифугированием или методом капли. Следует помнить, что в цитологическом препарате клетки не связаны друг с другом, и, работая с мазками шейки матки, нежелательно использовать центрифугирование, при котором клетки могут слипаться и смазывать всю картину; если есть хоть какая-то возможность получить мазки, окрашенные пероксидазой—антипероксидазой, лучше воспользоваться этим методом.

Как показывает наш опыт, мазки шейки матки можно готовить обычным способом. Другой цитологический материал, в частности клеточные линии и очищенные препараты лимфоцитов, лучше использовать в виде суспензий, полученных путем инокуляции клеток либо в изотонический физиологический раствор, либо в среду RPMI 1640 без добавок. Препараты из этих суспензий готовят методом капли или осаждения клеток на стекло центрифугированием суспензии с использованием, например, центрифуги фирмы Shandon, UK. При этом клетки на стекле могут образовывать сгустки, что мешает анализу (гл. 5, 6). Мазки можно получить, либо раскапав на стекла саму культуральную среду, либо проведя сначала фиксацию, а затем обработку, аналогичную той, которая используется для приготовления препаратов распластанных метафазных хромосом [10, 11]. Этот последний способ описан в протоколе 9.1. По нашим данным, он позволяет получать препараты с лучшей морфологией и распределением клеток.

Протокол 9.1. Приготовление цитологических препаратов

1. Готовят следующий раствор:

Метанол : уксусная кислота (МУК), 3:1 (о/о): сливают в вытяжном шкафу 25 мл ледяной уксусной кислоты и 75 мл метанола и перемешивают. Хранят раствор во льду не более 4 ч; для более длительного хранения держат его при $-20^{\circ}\text{C}^{1)}$.

2. Осаждают клетки центрифугированием при 600 g в течение 5–10 мин.

3. Удаляют по возможности весь супернатант, поставив пробирку в перевернутом виде на чистый лист бумаги.

4. Добавляют к осадку примерно такой же объем холодного МУК и аккуратно ресуспендируют клетки пипетированием.

5. Добавляют еще 10 объемов МУК, перемешивают содержимое пробирки, переворачивая ее несколько раз, и фиксируют клетки на льду в течение 20 мин.

Протокол 9.1 (Продолжение)

6. Осаждают клетки центрифугированием при 600 g в течение 5 мин (осадок увеличивается в объеме за счет разбухания клеток), удаляют фиксатор и ресуспендируют осадок в 10 объемах МУК.
7. Повторяют этап 6 дважды, чтобы максимально дегидратировать суспензию. Такую суспензию клеток можно хранить при -20°C до 1 года.
8. Осаждают клетки центрифугированием при 600 g в течение 5 мин и ресуспендируют их в свежеприготовленном холодном МУК до получения молочно-белой суспензии²⁾.
9. Раскапывают по 5–20 мкл суспензии (в зависимости от ее плотности) на чистые предметные стекла³⁾. По мере испарения фиксатора клетки сами распределяются по стеклу⁴⁾.

¹⁾ Этот раствор гигроскопичен, поэтому его следует хранить при -20°C .

²⁾ Не следует ресуспендировать клетки повторно, поскольку это приводит к потере нуклеиновых кислот. Если все же повторное ресуспендирование необходимо, то осадок хранят при -20°C в 70% этаноле (гл. 6).

³⁾ В большинстве случаев подходят обычные предметные стекла, не покрытые адгезивами. Если клетки разрушены плохо, то стекла можно силиконизировать (гл. 4).

⁴⁾ Когда суспензия дегидратирована, клетки распределяются по стеклу ровным слоем. Если в суспензии образуются капельки воды, повторяют этап 6, пока клетки не распределятся равномерно.

3. Фиксация препаратов и демаскирование нуклеиновых кислот

3.1. Фиксация

Для неизотопной гибридизации *in situ* с одинаковым успехом можно использовать препараты, приготовленные любым из упомянутых выше способов. Процедура фиксации, применимая для всех этих препаратов, описана в протоколе 9.2. Для фиксации последовательно используют МУК и параформальдегид, поскольку

- а) фиксация в МУК увеличивает клеточный объем и улучшает сохранность нуклеиновых кислот;
- б) фиксация альдегидом повышает устойчивость клеток к нагреванию, способствует сохранности морфологии и позволяет проводить денатурацию при более высокой температуре;
- в) альдегидная фиксация повышает чувствительность метода [12];

г) препараты перед гибридизацией подвергаются одинаковой обработке, что позволяет использовать стандартные процедуры гибридизации и детекции.

В некоторых случаях, например при работе с очищенными препаратами, в которых последовательность-мишень содержится в достаточно большом количестве, эти факторы незначительны, и достаточно фиксировать клетки в МУК в соответствии с протоколом 9.1. Дальнейшая предварительная обработка клеток необязательна и следует сразу же переходить к протоколу 9.3. Иногда (например, при гибридизации *in situ* с метафазными хромосомами) любая предобработка препаратов только ухудшает результаты [10, 11].

3.2. Демаскирование нуклеиновых кислот

После фиксации клеток в альдегиде необходимо демаскировать нуклеиновые кислоты с помощью частичного протеолиза (см. гл. 4). Как показывает наш опыт, лучше всего использовать для этого протеиназу К в низкой концентрации, хотя вполне пригодны и другие ферменты, например пепсин (гл. 6). Протеолиз — очень важный этап, поэтому необходимо тщательно контролировать концентрацию ферментов и проверять активность каждой партии на контрольной системе.

Подготовленные таким образом препараты можно непосредственно использовать для гибридизации *in situ*, однако в некоторых случаях (в частности, при работе с мазками шейки матки, полученными рутинным способом) приходится проводить постфиксацию препаратов параформальдегидом (протокол 9.2), чтобы уменьшить потери клеточного материала.

Протокол 9.2. Фиксация препаратов и демаскирование нуклеиновых кислот

Материалы

- Фосфатно-солевой буфер (ФСБ): 10 мМ фосфат, 150 мМ NaCl, pH 7,2
- ФСБ/глицин: 0,2% (в/о) глицин в ФСБ
- Метанол : уксусная кислота (3:1, о/о) (см. протокол 9.1)
- 4% (в/о) параформальдегид: растворяют 4 г параформальдегида (BDH) в 100 мл ФСБ, нагрев его до кипения в конической колбе с отливной воронкой. Все работы проводят в вытяжном шкафу. Охлаждают раствор во льду

Протокол 9.2 (Продолжение)

- Блокирующий раствор азид натрия/пероксид водорода: 0,1% (в/о) азид натрия, 0,3% (о/о) пероксид водорода в дистиллированной воде. Этот раствор следует готовить в вытяжном шкафу и работать в перчатках. Азид натрия высокотоксичен, поэтому все манипуляции с ним нужно проводить очень осторожно. 0,3% пероксид водорода готовят разбавлением водой имеющегося в продаже 30% раствора в отношении 1 : 100
- Протеиназа К (Boehringer Mannheim): 1 мкг/мл в ФСБ

Методика

А. Фиксация

Этот метод пригоден для мазков, фиксированных в этаноле с уксусной кислотой или без нее или высушенных на воздухе, а также для препаратов, полученных центрифугированием, или способом, описанным в протоколе 9.1¹⁾. Инкубацию проводят в химических стаканах.

1. На 10 мин погружают стекла в метанол/уксусную кислоту при комнатной температуре²⁾.
2. Переносят стекла в охлажденный параформальдегид и инкубируют 15 мин при комнатной температуре.
3. Инкубируют в растворе ФСБ/глицин, а затем в ФСБ, по 5 мин в каждом растворе.
4. Фиксированные таким образом препараты можно использовать сразу же или хранить при комнатной температуре.

Б. Блокирование эндогенной пероксидазы

1. Инкубируют стекла в блокирующем растворе азид натрия с пероксидом водорода в течение 20 мин при комнатной температуре.
2. Промывают стекла в ФСБ в течение 5 мин.

В. Демаскирование нуклеиновых кислот

Как показывает наш опыт, лучшие результаты дает использование протеиназы К. Другие ферменты описаны в гл. 4; возможность их применения для протеолиза в данной ситуации определяют опытным путем.

1. Прогревают раствор протеиназы К до 37 °С.
2. Используют свежefиксированные препараты или препараты, промытые после хранения в ФСБ.

3. Погружают стекла в раствор протеиназы К и инкубируют 15 мин при 37 °С.
4. Промывают препараты в свежеприготовленном ФСБ, затем 5 мин фиксируют в 4% параформальдегиде при комнатной температуре³⁾.
5. Промывают препараты в растворе ФСБ/глицин, приготовленном в соответствии с протоколом 9.2, затем в ФСБ, по 5 мин в каждом растворе.
6. Высушивают на воздухе при 75 °С.

¹⁾ Перед анализом мазков шейки матки, окрашенных ПАП, выдерживают стекла в ксилоле при 42 °С в течение ночи, удаляют покровные стекла, промывают препараты свежим ксилолом, проводят через батарею спиртов и промывают водой. Высушенные на воздухе мазки фиксируют в МУК.

²⁾ На этом этапе фиксируют ранее нефиксированные мазки, удаляют полиэтиленгликоль из препаратов, окрашенных карбоваксом, содержащим фиксаторы, и обесцвечивают мазки, окрашенные с помощью ПАП.

³⁾ Промывание препаратов в ФСБ уменьшает фон.

4. Денатурация и гибридизация

Требования к зондам, а также условия денатурации мишеней и гибридизации детально рассмотрены в гл. 4 и в статье [13]. Однако при работе с цитологическими препаратами возникают свои трудности, которые мы здесь обсудим. В мазках шейки матки присутствует внеклеточный муцин, на который осаждается субстрат. Это может привести к сильному фоновому окрашиванию вследствие как неспецифического связывания зонда, так и неферментативных изменений субстрата. Для уменьшения фона мы использовали несколько разных способов и обнаружили, что хороший эффект дает добавление в гибридизационную смесь макромолекул (табл. 9.1). Впрочем, фон не исчезает полностью, и приходит-

Таблица 9.1. Дополнительные компоненты, необходимые для гибридизации в случае мазков шейки матки

Пирофосфат натрия
Поливинилпирролидон (молярная масса 40 000)
Фиколл (молярная масса 400 000)
ДНК человека (для вирусных последовательностей) в количестве, превышающем в 100–1000 раз количество зонда
ДНК спермы лосося или сельди (для геномных последовательностей человека) в количестве, превышающем в 100–1000 раз количество зонда

ся принимать дополнительные меры (разд. 5). Приготовление гибридационной смеси детально описано в протоколе 9.3. Предгибридационная инкубация препаратов в этой смеси в отсутствие ДНК-зонда неэффективна. При выявлении ДНК тепловую денатурацию зонда и мишени рекомендуется проводить одновременно (гл. 4), и лучше это делать, нанеся зонд непосредственно на препарат, как это описано в протоколе 9.3. Для гибридизации *in situ* с двумя зондами зонды, меченные разными молекулами-свидетелями, можно смешать и денатурировать одновременно (протокол 9.3). На каждый препарат необходимо наносить столько гибридационной смеси, чтобы не допустить подсыхания во время денатурации и гибридизации. Как показывает наш опыт, если денатурацию проводят при температуре ниже 100 °С, а гибридизацию — при температуре 42 °С в течение 2–16 ч, то для обычных мазков шейки матки достаточно 50 мкл гибридационной смеси. Точный объем следует подбирать экспериментально, и если подсыхание все-таки происходит, препараты следует накрыть покровными стеклами и промазать по краям резиновым клеем.

Протокол 9.3. Денатурация и гибридизация

Для обнаружения вирусных последовательностей нужна фрагментированная ДНК человека, а для выявления ДНК человека — фрагментированная ДНК спермы сельди или лосося.

Материалы

- Гибридационная смесь (протокол 4.5)
- Буфер ТЭ-ППФ: 500 мМ трис-НСl, рН 8,0, содержащий 50 мМ ЭДТА, 1% (в/о) пирофосфат натрия, 2% (в/о) поливинилпирролидон (мол. масса 40 000), 2% фиколл (мол. масса 400 000). Для растворения компонентов нагревают эту смесь до 65 °С, после растворения инкубируют при этой температуре 15 мин. Буфер можно хранить при комнатной температуре
- ДНК человека (для вирусных последовательностей): выделяют ДНК из лимфоцитов периферической крови (см. гл. 12) и растворяют в воде до концентрации 10 мг/мл. Фрагментируют ДНК в течение 20 мин в автоклаве
- ДНК спермы сельди (для геномных последовательностей): растворяют ДНК в воде до концентрации 10 мг/мл и фрагментируют, как описано выше

Методика

1. На каждые 35 мкл гибридизационного буфера добавляют по 1 мкл ДНК спермы сельди и зондов. В наших опытах конечная концентрация зондов составляет 1–2 мкл/мл, но, вообще говоря, концентрацию следует подбирать опытным путем. Зонды можно добавлять по отдельности или все вместе; они могут быть помечены молекулами-свидетелями¹⁾ одного или нескольких типов.
2. Добавляют буфер ТЭ-ППФ до конечного объема 50 мкл и не продолжительное время перемешивают на встряхивателе.
3. Наносят полученную смесь на мазки, приготовленные так, как это описано в протоколах 9.1 и 9.2, и накрывают подходящими по размеру покровными стеклами. Для клеточных суспензий мы используем предметные стекла с четырьмя ячейками (Hendley, Essex), внося в каждую ячейку примерно 5,5 мкл гибридизационной смеси, и круглые покровные стекла диаметром 14 мм. В случае обычных мазков шейки матки наносят по 50 мкл на препарат и накрывают покровным стеклом 22 × 50 мм.
4. Помещают по два предметных стекла в каждую микротитровальную плашку (Gibco, UK) с небольшим количеством воды во избежание подсыхания препаратов и проводят денатурацию при 95 °C в течение 15 мин в сухом термостате. Денатурацию препаратов, фиксированных только с помощью МУК, проводят при 75 °C в течение 6–7 мин²⁾.
5. Переносят препараты в термостат на 42 °C и инкубируют 2 ч.

¹⁾ Зонды, меченные разными молекулами-свидетелями, можно смешивать и денатурировать или гибридизовать вместе [14].

²⁾ Препараты, фиксированные только с помощью МУК, следует денатурировать при более низкой температуре. Нагревание до 95 °C приводит к лизису.

5. Отмывание препаратов после гибридизации и детекция

5.1. Отмывание

Компоненты, не прореагировавшие при гибридизации, удаляют промыванием в растворе, не дестабилизирующем двухцепочечные гибриды зонд/мишень. Для этого определяют условия, при которых обеспечивается максимальное удаление «неправильных» гибридов. Чтобы уменьшить неспецифическое окрашивание, блокируют участки связывания антитела и авидина и ингибируют эн-

догенные ферменты (гл. 4). Это очень важно для повышения специфичности и чувствительности неизотопной гибридизации *in situ*, особенно при работе с цитологическими препаратами. Детально эти вопросы рассмотрены в протоколе 9.4, а в общем виде обсуждаются в гл. 4. Ингибировать эндогенные ферменты можно на любой стадии до нанесения субстрата. В случае иммуноцитохимической детекции с помощью пероксидазы ингибирование обычно проводят после инкубации препаратов с первыми антителами, чтобы предотвратить разрушение антигенов в блокирующем растворе. При гибридизации *in situ* такой проблемы не возникает, поскольку молекулы-свидетели достаточно стабильны. Однако, если используется комплекс пероксид/азид натрия, в принципе может происходить химическая модификация зондов и мишеней, поэтому мы проводим блокирование пероксидазы до демаскирования. Это обеспечивает эффективное ингибирование пероксидазы эритроцитов и нейтрофилов в мазках шейки матки. Детально соответствующая процедура описана в протоколе 9.2.

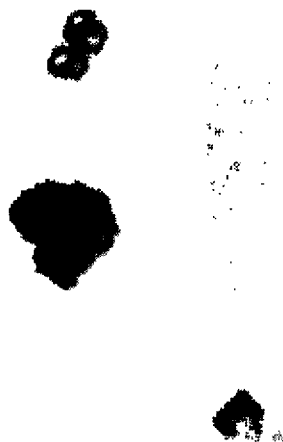


Рис. 9.1. Гибридизация *in situ* смеси меченных диоксигенином зондов, специфичных к ДНК HPV 6, 11, 16, 18 и 33, с клетками мазка шейки матки. Детекцию проводили в соответствии с протоколом 9.4. Зонд локализован в ядре эпителиальных клеток. [Troncone et al. (1992). J. Clin. Pathol., 45, No. 10.]

5.2. Детекция гибридизовавшегося зонда

Для детекции иммуномеченных зондов применяются те же подходы, что и для иммуноцитохимической локализации антигенов (гл. 2). Один момент, на который очень важно обратить внимание, — это повышение чувствительности при выявлении вирусных последовательностей в мазках шейки матки; для этого прибегают к процедуре наслаивания антител, описанной в протоколе 9.4 для зондов, меченных дигоксигенином (рис. 9.1). Покажем, что это позволяет обнаружить в клеточном материале всего 10 геномных копий вируса папилломы при длине каждой из копий примерно 8 т.н. [15]. Чтобы повысить чувствительность еще больше, проводят повторные инкубации с антителами. В результате удается обнаружить 1–2 геномные копии вируса HPV 16 в культуре клеток линии SiHa (протокол 9.4, ч. Б) [16]. Однако при рутинном анализе мазков этот метод может дать слишком большой фон, и в этом случае лучше использовать процедуру, описанную в ч. А протокола 9.4.

Протокол 9.4. Отмывание препаратов после гибридизации и детекция одного зонда

Эти протоколы применимы как для одного зонда, так и для смеси зондов, меченных дигоксигенином. Биотинилированные зонды можно детектировать таким же способом, заменив в п. 3, ч. А антитела к дигоксигенину моноклональными антителами к биотину.

Материалы

- 20 × SSC: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0. Этот буфер разводят до нужной концентрации дистиллированной водой
- Трис-солевой буфер (ТСБ): 50 мМ трис-HCl, 100 мМ NaCl, pH 7,2
- Трис-БСА-тритон (ТБТ): ТСБ, содержащий 3% (в/о) БСА, 0,05% (о/о) тритон-100
- Моноклональные антитела к дигоксину (Sigma, UK), биотинилированные кроличьи антитела к иммуноглобулину мыши [фрагмент F(ab)₂] (Dako, UK), авидин, конъюгированный с пероксидазой (Dako, UK)
- Субстрат 3-амино-9-этилкарбазол/пероксид водорода (АЭК/Н₂O₂): можно получить готовый субстрат в составе набора (Zymed, USA) или в виде таблеток (Dako, UK) либо приготовить раствор из твердого субстрата (гл. 4)

Протокол 9.4 (Продолжение)

А. Стандартная процедура обработки препаратов

1. Промывают препараты в 4 × SSC при комнатной температуре, дважды по 5 мин, для отделения покровных стекол.
2. Инкубируют препараты в ТБТ в течение 10 мин при комнатной температуре.
3. Инкубируют препараты с моноклональными антителами к дигоксигенину, разведенными в ТБТ¹⁾ в отношении 1 : 10 000, в течение 30 мин при комнатной температуре; промывают в двух сменах ТСБ, по 5 мин в каждой.
4. Инкубируют препараты с биотинилированными кроличьими антителами к иммуноглобулину мыши [фрагмент F(ab)₂], разведенными ТБТ в отношении 1 : 200, в течение 30 мин при комнатной температуре; промывают препараты в двух сменах ТСБ, по 5 мин в каждой.
5. Инкубируют препараты 30 мин при комнатной температуре с авидином, конъюгированным с пероксидазой; конъюгат разведен в ТБТ, содержащем 5% (в/о) обезжиренное молоко (Cadbury, UK), в отношении 1 : 75. Затем промывают препараты в двух сменах ТСБ, по 5 мин в каждой.
6. Инкубируют препараты в АЭК/ H_2O_2 в течение 15 мин при комнатной температуре.
7. Промывают препараты в дистиллированной воде и высушивают их на воздухе.
8. Контрастируют препараты в гематоксилине (обычно в течение 5–20 с), промывают в дистиллированной воде и высушивают на воздухе.
9. Заключают препараты в водорастворимую среду, например глицерин с желатиной (гл. 4).

Б. Обработка препаратов, повышающая чувствительность

1. Проводят процедуры, описанные в пп. 1–4 ч. А.
2. Инкубируют препараты с моноклональными антителами к биотину (Dako, UK), разведенными в ТБТ в отношении 1 : 50, в течение 30 мин при комнатной температуре.
3. Дважды по 5 мин промывают препараты в ТСБ.
4. Проводят операции, описанные в ч. А, начиная с п. 4.

¹⁾ Для детекции биотинилированных зондов используют моноклональные антитела к биотину, разведенные в ТБТ в отношении 1 : 50.

Протокол 9.5. Детекция двух разных зондов¹⁾

Эти протоколы предназначены для одновременного выявления разных подтипов вируса папилломы (HPV) в мазках шейки матки с помощью ДНК-зондов, меченных биотином и дигоксигенином.

А. Одноэтапная детекция

1. Проводят операции, описанные в пп. 1–3 протокола 9.4.
2. На каждые 600 мкл ТБТ, содержащего 5% (в/о) обезжиренное молоко, добавляют 1 мкл авидина, конъюгированного с пероксидазой (Dako, UK), и 6 мкл щелочной фосфатазы, конъюгированной с антителами к дигоксигенину (Boehringer Mannheim); инкубируют препараты в этом растворе при комнатной температуре в течение 30 мин.
3. Промывают в ТСБ дважды по 5 мин.
4. Проявляют биотин (красная метка), инкубируя препарат с субстратом АЭК/Н₂O₂ при комнатной температуре в течение 15–30 мин (протокол 9.4), и промывают препараты в двух сменах ТСБ, по 5 мин в каждой.
5. Проявляют дигоксигенин (темно-синий цвет), инкубируя препарат с субстратом нитросиний тетразолий/5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (см. протокол 4.7) при комнатной температуре в течение 30–60 мин.
6. Промывают препараты в дистиллированной воде и заключают в водорастворимую среду, например в глицерин с желатиной (гл. 4).

Б. Детекция с амплификацией

1. Проводят операции, описанные в пп. 1–3 протокола 9.4.
2. Инкубируют препараты с моноклональными антителами к биотину, разведенными в ТБТ в отношении 1:50, в течение 30 мин при комнатной температуре.
3. Инкубируют препараты с биотинилированными кроличьими антителами к иммуноглобулину мыши [фрагмент F(ab)₂], разведенными в ТБТ в отношении 1:200, в течение 30 мин при комнатной температуре.
4. Проводят операции, описанные в пп. 2–6 ч. А.

¹⁾ Состав необходимых растворов дан в протоколе 9.4.

6. Контроли

Чтобы быть уверенным в специфичности регистрируемого сигнала, каждый эксперимент следует сопровождать контролем. Общие принципы контроля гибридизации *in situ* обсуждаются в гл. 4. Однако при анализе цитологических препаратов, в частности мазков шейки матки, возникают особые проблемы. Так, если исследуется материал, заключенный в парафин, то для контроля можно использовать серийные срезы. В то же время цитологические препараты, приготовленные из одной и той же ткани, содержат разные клетки-мишени. Это следует иметь в виду, ставя контрольные опыты при работе с мазками. В случае мазков шейки матки ситуация осложняется тем, что обычно берут только один мазок. При исследовании цитологических препаратов ставят два типа контролей: параллельный и внутренний.

6.1. Параллельный контроль

Речь идет об использовании для гибридизации заведомо положительного контрольного зонда. Так, можно провести гибридизацию клеток CaSki с HPV16-зондом или гибридизацию репрезентативного мазка шейки матки с зондом для ДНК человека. Этот контрольный эксперимент позволяет убедиться в том, что в техническом отношении все процедуры выполнены правильно, однако он ничего не говорит о специфичности зонда.

6.2. Внутренний контроль

Чтобы убедиться в специфичности гибридизации и исключить получение ложноотрицательных результатов при ограниченном количестве цитологического материала, необходимо провести одновременную или последовательную двойную гибридизацию с использованием контрольного и тест-зондов. Это аналогично одновременной амплификации конститутивных геномных последовательностей, например амплификации гена β -глобина и другой, интересующей нас последовательности с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) (см. гл. 17). Для выявления ДНК HPV в мазках шейки матки можно использовать два подхода: одновременную гибридизацию с какой-нибудь геномной последовательностью и с HPV-зондом с последующей детекцией одним из способов, описанных в протоколе 9.5, либо последовательную гибридизацию с ДНК HPV кожи и с ДНК HPV интересующего нас



Рис. 9.2. Гибридизация *in situ* в жестких условиях зонда (D1121), высоко-специфичного к околоцентромерной области хромосомы 11, с клетками CaSki, полученными из карциномы шейки матки. В каждом ядре видно по четыре метки, что указывает на присутствие четырех производных хромосомы 11.

типа, например HPV 6, 11 и т. д. [17]. Контроль с одновременной гибридизацией позволяет судить об адекватности образца и имеет то преимущество перед использованием разных мазков и гибридизацией с суммарной геномной ДНК (см. выше), что позволяет судить о доступности нуклеиновых кислот мазка для зонда. Оптимальными зондами для внутреннего контроля являются не кодирующие высокоповторяющиеся последовательности, например альфоидная ДНК (гл. 6 и рис. 9.2). Для контроля неспецифической гибридизации с вектором и подбора уровня жесткости условий гибридизации используют последовательности кожных типов HPV, клонированные в том же векторе, что и последовательности аногенитальных типов вируса. При последовательной гибридизации мазков шейки матки с ДНК HPV 2, а затем со смесью ДНК HPV 6, 11, 16, 18 и 33 в такой же суммарной концентрации сигнал был получен только для смеси зондов при проведении процедуры по протоколу 9.4 [17].

7. Интерпретация результатов

Возможность интерпретации результатов гибридизации на цитологических препаратах зависит не только от чувствительности системы детекции и специфичности зонда, но и от установления локализации сигнала.

7.1. Локализация сигнала

Недостатком двойных систем детекции является то, что при контрастировании всегда происходит маскирование гибридизационного сигнала. Ядерные и цитоплазматические мембраны можно локализовать с помощью фазовоконтрастного микроскопа, но это существенно усложняет анализ. Можно использовать систему детекции одного зонда, описанную в протоколе 9.4; в этом случае контрастирование не влияет на гибридизационный сигнал. Преимущество этого способа состоит в том, что существует прямая корреляция между наличием определенных нуклеотидных последовательностей и морфологическими структурами. Что касается обнаружения HPV в обычных мазках шейки матки, то гибридизационный сигнал может обнаруживаться в нормальных, койлоцитных и безъядерных клетках [16]. Поскольку для гибридизации используется только смесь зондов, точное типирование в этом случае оказывается невозможным.

7.2. Чувствительность метода

Чувствительность системы детекции с одним зондом, описанной в протоколе 9.4, составляет менее 10 копий ДНК HPV, т. е. по меньшей мере 80 т.н. интегрированной ДНК-мишени на клетку [15]. У одноэтапной системы детекции двух зондов чувствительность меньше: примерно 40 копий ДНК HPV на клетку [12], но она позволяет дифференцировать разные типы HPV в одном мазке [13, 17]. Двойная система детекции с амплификацией объединяет системы с низкой и высокой чувствительностью, позволяя проводить высокочувствительное определение HPV и не требующую высокой чувствительности детекцию последовательностей ДНК с большим числом повторов.

7.3. Специфичность

Точность ГИС определяется специфичностью гибридизации при условии, что регистрируемый сигнал обусловлен именно гибридизацией зонда. Неспецифическое связывание зонда можно

исключить с помощью соответствующего контроля (см. выше). Специфичность гибридизации зависит от жесткости условий, в которых она проводится (гл. 4), при этом условия нельзя найти из уравнений кинетики реассоциации в растворе, их приходится подбирать опытным путем. При гибридизации с хромосомоспецифичными зондами для этого сравнивают полученные результаты с локализацией гибридизационного сигнала на метафазных хромосомах. В тех случаях, когда нужно различить близкородственные последовательности, например ДНК одного и того же вируса разных типов, условия гибридизации нужно подбирать, используя материал, инфицированный вирусом заведомо известного типа. Если это НРV-инфекция, то используют клеточные линии, содержащие ДНК НРV 16 и 18, или анализируют биоптаты с помощью других молекулярных методов, например ПЦР [18]. При этом полученные результаты нельзя прямо экстраполировать на другие типы. Предположим, что в условиях, описанных в протоколе 9.4, удастся различить НРV 6 и 11, НРV 16 и 18 или НРV 16 и 18. Отсюда не следует, что в этих же условиях можно различить НРV 16 и 33 [19]. Более подробно этот вопрос обсуждается в гл. 4 и в работах [19, 20].

8. Практическое применение гибридизации *in situ*

Теоретически метод гибридизации *in situ* пригоден для анализа любого цитологического материала, однако на практике он пока применяется не очень широко. Самый большой опыт накоплен в выявлении этим методом вирусных геномов, особенно в мазках шейки матки. Методики, описанные в данной главе, были разработаны для рутинного выявления НРV в этих мазках и применялись для разграничения типов НРV с высокой и низкой патогенностью [17–20]. В принципе они применимы для обнаружения других ДНК-содержащих вирусов, в частности вируса герпеса, и уже использовались для анализа клеточных культур, аспиратов и мазков шейки матки. С помощью хромосомоспецифичных зондов (см. также гл. 6) можно определить как принадлежность цитологических образцов к определенному полу [21], так и их хромосомный состав (рис. 9.2). В клинике эти методы еще не освоены, однако возможность сопоставления данных по клеточной морфологии и по локализации гибридизационного сигнала и наличие методики, позволяющей провести анализ в течение рабочего дня, позволяют надеяться, что со временем ГИС станет обычным методом клинических исследований.

Благодарности

С. Х. является стажером клинической лаборатории CRC и стипендиатом Green College, Oxford. Работа Дж. О'Д. М. финансировалась из средств гранта, предоставленного Cancer Research Campaign (UK).

Литература

1. *Wagner D., Ikenberg H., Boehm N., Gissmann L.* (1984). *Obstet. Gynaecol.*, **64**, 767.
2. *Toon P. G., Arrand J. R., Wilson L. P., Sharp D. S.* (1986). *Br. Med. J.*, **293**, 1261.
3. *Young L. S., Bevan J. S., Johnson M. A., Blomfield P. I., Bromidge T., Maitland N. J., Woodman C. B. J.* (1989). *Br. Med. J.*, **298**, 14.
4. *Manos M., Lee K., Greer C., Christoferson R., Pearson T. A.* (1990). *Lancet*, **335**, 734.
5. *Bauer H. M., Ting Y. I., Greer C. E., Chambers J. C., Tashiro C. J., Chimera J., Teingold A., Manos M.* (1991). *J. Am. Med. Assoc.*, **265**, 472.
6. *van den Brule A. J. C., Walboomers J. M. M., du Maine P., Kenemans P., Meijer C. J. L. M.* (1991). *Int. J. Cancer*, **48**, 404.
7. *Pao C. C., Lai C.-H., Wu S.-Y., Young K.-C., Chang P.-L., Soong Y.-K.* (1989). *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 168.
8. *Gupta J., Gendelman H. E., Naghashfar Z., Gupta P., Rosenshein N., Sawada E. et al.* (1985). *Int. J. Gynaecol. Oncol.*, **4**, 211.
9. *Gupta J. W., Gupta P. K., Rosenhein N., Shah K. V.* (1987). *Acta Cytol.*, **31**, 387.
10. *Bhatt B., McGee J. O'D.* (1990). In: *In situ hybridization: principles and practice* (ed. J. M. Polak, J. O'D. McGee), p. 149. Oxford University Press, Oxford.
11. *Rooney D. E., Czepulkowski B. H.* (ed). (1986). *Human cytogenetics: a practical approach*, IRL Press, Oxford.
12. *Herrington C. S., Burns J., Graham A. K., Evans M. F., McGee J. O'D.* (1989). *J. Clin. Pathol.*, **42**, 592.
13. *Hames B. D., Higgins S. J.* (ed). (1985). *Nucleic acid hybridization: a practical approach*. IRL Press, Oxford.
14. *Herrington C. S., Burns J., Graham A. K., Bhatt B., McGee J. O'D.* (1989). *J. Clin. Pathol.*, **42**, 601.
15. *Herrington C. S., Graham A. K., McGee J. O'D.* (1991). *J. Clin. Pathol.*, **44**, 33.
16. *Herrington C. S., de Angelis M.-L., Evans M. F., Troncone G., McGee J. O'D.* (1989). *J. Clin. Pathol.*, **45**, 601.
17. *Herrington C. S., Troncone G., McGee J. O'D.* (1992). *Cytopathology*, **3**, 71.
18. *Herrington C. S., Flannery D. M. J., McGee J. O'D.* (1990). In: *In situ hybridization: principles and practice* (ed. J. M. Polak and O'D. McGee), p. 187. Oxford University Press, Oxford.
19. *Herrington C. S., Anderson S., Graham A. K., McGee J. O'D.* (1992). *Histochem. J.* (In press).
20. *Herrington C. S., Burns J., Graham A. K., McGee J. O'D.* (1992). *Histochem. J.*, **22**, 545.
21. *Burns J., Chan V. T.-W., Jonasson J. A., Fleming K. A., Taylor S., McGee J. O'D.* (1985). *J. Clin. Pathol.*, **38**, 1085. (1992). *Histochem. J.* (In press).

РАЙОНЫ ЯДРЫШКОВОГО ОРГАНИЗАТОРА И ФИБРИЛЛЯРНЫЕ ЦЕНТРЫ

Джон Крокер

1. Введение

Район ядрышкового организатора (ЯОР) — это участок хромосомной ДНК, кодирующий рибосомную РНК (цистроны рДНК). Именно эта РНК в конечном счете ответственна за сборку рибосом. Под контролем ЯОР 18S- и 28S-субъединицы объединяются с образующимися вне ядрышка 5S-субъединицами, которые для образования зрелых рибосом транспортируются через ядерные поры [1—3]. Таким образом, активно транскрибирующиеся ЯОР можно назвать фабрикой рибосом. У большинства видов животных и растений ЯОР занимают определенные участки на отдельных хромосомах; например, у человека они располагаются на коротком плече пяти акроцентрических хромосом 13, 14, 15, 21, 22. При использовании стандартной методики Гимза в ЯОР обнаруживаются непрокрашенные участки и создается впечатление разрывности хромосом в этом месте. На самом деле, конечно, хромосома непрерывна и, как показывают более тонкие методы, непрокрашенные участки представляют собой какие-то специализированные структуры [1, 3]. С помощью описанных ниже более специфических методов можно показать, что не все ЯОР активно транскрибируются и, следовательно, не все они могут быть идентифицированы. В принципе в метафазе может быть выявлено 20 ЯОР, но обнаружение такого числа ЯОР является делом случая и обычно на метафазных пластинках диплоидных клеток человека их обнаруживается не более 10.

Конденсация хромосом во время интерфазы сопровождается слиянием ЯОР с образованием ядрышковых комплексов, в которых самим ЯОР скорее всего соответствуют фибриллярные центры (см. ниже). Ядрышко состоит из трех наблюдаемых при обычной трансмиссионной электронной микроскопии компонент (рис. 10.1) [4]:

- фибриллярный центр: аргирофильная электронопрозрачная структура; иногда в ней выявляются ЯОР-ассоциированные белки;



Рис. 10.1. Электронно-микроскопическая фотография клетки мало дифференцированной неходжкинской лимфомы. Хорошо видно ядрышко с центральным сравнительно электропрозрачным ЯОР. ([20]; с любезного разрешения Journal of Pathology.)

- плотный фибриллярный компонент: окружающая фибриллярный центр сравнительно электроплотная область, содержит предшественники рРНК и некоторые ДНК;
- гранулярный компонент: периферический слой, состоящий из предшественников рибосом. Здесь происходит созревание рРНК.

2. Методы выявления ЯОР/фибриллярных центров

Мы не ставим своей целью детальное описание этих методов применительно к цитогенетике. Отметим, что четкого количественного соответствия между «интерфазными ЯОР» (фибриллярными центрами) и метафазными ЯОР не существует [5], хотя в

Таблица 10.1. Некоторые ЯОР-ассоциированные белки

Белок	Метод выявления
РНК-полимераза I	Аргирофилия, иммуногистология
Белок C23 (нуклеолин)	Аргирофилия, иммуногистология
Белок B23 (нуматрин)	Аргирофилия, иммуногистология
Белок 80 K	Иммуноблоттинг
Белок 100 K	Связывание висмута
Фосфопротеин pp135	Иммуногистология

целом методы их обнаружения весьма сходны. За исключением гибридизации *in situ* (см. ниже), они основаны на выявлении ЯОР-ассоциированных белков (табл. 10.1). Некоторые из используемых для выявления ЯОР методов перечислены в табл. 10.2.

Таблица 10.2. Некоторые методы выявления ЯОР

Традиционная электронная микроскопия
Гибридизация <i>in situ</i> с рРНК
Окрашивание коллоидным серебром
Связывание висмута
Связывание ртути и дибромфлуоресцеина
Иммунохимическое окрашивание

2.1. Применение

Выявление ЯОР на хромосомах применяется в следующих диагностических и исследовательских целях:

- обнаружение полиморфных вариантов хромосом 13, 14, 15, 21, 22 в препаратах мейотических и митотических хромосом;
- локализация рДНК (18S и 28S) на метафазных хромосомах в митозе и мейозе и в интерфазном ядре;
- выявление акроцентрических хромосом, участвующих в сбалансированных и несбалансированных транслокациях и перестройках с участием хромосом 13, 14, 15, 21, 22;
- помощь в идентификации и в определении происхождения маркерных хромосом, образовавшихся при участии акроцентрических хромосом;
- выявление участков короткого плеча при Робертсоновских транслокациях с участием акроцентрических хромосом;
- выявление микроядрышек в мейотических клетках.

2.2. Окрашивание серебром ЯОР метафазных хромосом

Обычно окрашивание проводят при температуре 60 °С, хотя в случае цитологических и гистологических препаратов соответствующие реакции лучше идут при 20 °С («комнатная температура»). В протоколе 10.1 описан рутинный метод окрашивания метафазных пластинок, а на рис. 10.2 представлены результаты окрашивания митотических хромосом человека с помощью AgNO_3 .



Рис. 10.2. Метафазная пластинка хромосом человека (69, XXX). Окрашенные серебром ЯОР указаны стрелками. (Фотография любезно предоставлена Mrs. Susan Armstrong, Regional Cytogenetics Laboratory, East Birmingham Hospital.)

Протокол 10.1. Окрашивание серебром ЯОР на хромосомах

1. Обычным способом готовят метафазные пластинки хромосом (см. [6]).
2. На каждый препарат наносят 3–4 капли раствора нитрата серебра (50 г/дл в 0,03% формалине), накрывают его покровным стеклом и края заливают резиновым клеем (типа «Holdtite»).
3. Инкубируют препараты в химическом стакане, содержащем небольшое количество частично испарившейся воды, при 60 °С в течение 1 ч.

4. Проверяют интенсивность окрашивания под световым микроскопом. Участки ЯОР должны выглядеть как черные точки на хромосомах.
5. Проводят стандартное окрашивание по Гимза (10% раствор Гимза в фосфатном буфере, рН 6,8).

2.3. Окрашивание серебром интерфазных фибриллярных центров

Техника окрашивания коллоидным серебром для выявления белков, ассоциированных с ЯОР и фибриллярными центрами, высокоспецифична. К счастью, этот метод может использоваться для анализа фиксированных формалином и залитых в парафин тканей (в том числе архивных материалов), а также замороженных срезов, цитологических мазков и препаратов, полученных центрифугированием. Данный метод получил общепринятое название AgЯОР; он описан в протоколе 10.2. На рис. 10.3 и 10.4 представлены аргирофильные интерфазные ЯОР.



Рис. 10.3. «Интерфазные AgЯОР» (черные точки) в срезе плоскоклеточной карциномы.



Рис. 10.4. «Интерфазные AgЯОР» в лимфоцитарном инфильтрате при раке легких. Каждое ядро содержит 1–2 AgЯОР.

В нашей лаборатории с помощью этого метода мы проводим рутинное окрашивание метакрилатных срезов толщиной 1 мкм. Необходимо, однако, заметить, что при такой малой толщине теряется больше ЯОР.

Протокол 10.2. Метод AgЯОР для выявления интерфазных ЯОР/фибриллярных центров

1. Обычным способом готовят парафиновые срезы толщиной 3 мкм, замороженные срезы толщиной 4 мкм или цитологические мазки. Препараты фиксируют в 100% этаноле или в 100% метаноле при комнатной температуре в течение 10 мин.
2. Смешивают в равных количествах следующие реактивы:
 - желатина (2 г/дл) в водном растворе муравьиной кислоты (1 г/дл);
 - водный раствор нитрата серебра (50 г/дл).
3. Заливают полученной смесью срезы и инкубируют их в течение 30–60 мин в защищенном от света месте (согласно условиям для Kodak 1A) при комнатной температуре.

4. Тщательно промывают препараты в дважды дистиллированной и деионизованной воде.
5. При необходимости проводят контрастирование в стандартном растворе гемалюма Майера в течение 2–5 мин.
6. Дегидратируют срезы в батарее спиртов (например, в 50, 70 и 100% этаноле), промывают в ксилоле и монтируют с использованием синтетической среды (типа DPX, BDH, UK).

2.3.1. Фоновое окрашивание

Фоновое окрашивание может стать серьезной проблемой в следующих случаях:

- ткань содержит большие количества коллагена;
- в ткани есть крупные очаги некроза;
- используемые стеклянная и пластиковая посуда и водные растворы не являются абсолютно чистыми.

Для решения этой проблемы можно использовать два подхода: физический и основанный на химической модификации.

В первом случае фон уменьшают, создавая «барьер» между реакционной смесью и срезом [7, 8] или используя силу тяготения [9]. Ниже описаны эти методы и два способа химической модификации [10, 11].

- а. На срез кладут смоченный в стандартном растворе для AgЯОР-реакции кусочек тонкой сетчатой нейлоновой ткани и проводят операции, описанные в протоколе 10.2 [7].
- б. Обработывают парафиновые срезы в течение 5 мин смесью уксусной кислоты и этанола (1:3, о/о), промывают их 100% этанолом и переносят в раствор целлоидина (1 г/дл) в смеси этанола с диэтиловым эфиром (1:1, о/о), выдерживают 1 мин, сливают раствор и до отвердевания целлоидина переносят срезы в 70% этанол. Промывают срезы в чистой воде и окрашивают, как описано в протоколе 10.2 [8].
- в. Чтобы использовать для уменьшения фона силу тяготения, AgЯОР-реакцию проводят в закрытом блоке Shandon Cadenza/Sequenza (Shandon Scientific, UK), поместив срезы на предметных стеклах лицевой стороной вниз. Промывка и монтирование срезов проводятся при этом, как обычно [9].
- г. После депарафинирования срезы высушивают и помещают на 1–2 ч в стандартный реактив Шиффа. Затем промывают их в чистой воде и окрашивают AgЯОР, как описано в протоколе 10.2 [10].

- д. Заменяют в обычном методе окрашивания желатину на полиэтиленгликоль (мол. масса 20 000) в концентрации 1 мг/мл и проводят AgЯОР-реакцию, как описано в протоколе 10.2, но с инкубацией в течение 20 мин при 40 °C [11].

2.3.2. Совместимость фиксации и AgЯОР-реакции

Некоторые методы фиксации отлично сочетаются с последующей AgЯОР-реакцией, тогда как другие оказываются мало совместимыми. В табл. 10.3 приведены данные по влиянию разных методов фиксации на окрашивание серебром.

Механизм влияния фиксации на окрашивание неоднократно обсуждался (см., например, [12]). Так, негативный эффект фиксаторов на основе ртути можно объяснить тем, что ионы Hg^{2+} блокируют связывающие серебро SH- и S—S-группы. Фиксаторы на основе бихромата окисляют сульфгидрильные группы.

Таблица 10.3. Фиксирующие растворы и AgЯОР-метод

Окрашивание отсутствует	Слабое окрашивание	Хорошее окрашивание	Очень хорошее окрашивание
Чистый формальдегид	2,5% глутаральдегид	10% солевой раствор формальдегида	10% нейтральный забуференный солевой раствор формальдегида
Фиксатор Хелли	Бихромат—периодная кислота—лизин—	Фиксатор Боуэна	раствор формальдегида
Фиксатор Зенкера	параформальдегид	10% формальдегид	10% кальциевый раствор формальдегида
Глутаральдегид/пикриновая кислота	4% параформальдегид	в уксусной кислоте	Фиксатор Карнуа Этанол : ацетон (1 : 1) Жидкость Кларка (свежие ткани)

2.3.3. Факторы, которые необходимо учитывать при проведении AgЯОР-реакции

- В результате обычной ионной реакции ионы Ag^+ и Cl^- могут образовывать осадок хлорида серебра AgCl , поэтому для приготовления всех растворов и промывания срезов необходимо использовать **очень чистую воду**, лучше всего — очищенную электрофоретически или деионизованную дистиллированную воду.
- Важно учитывать особенности методов фиксации: одни фиксаторы никак не влияют на окрашивание, другие существенно ухудшают результаты (см. табл. 10.3). Не исключено, что в каких-то случаях придется изменить время окрашивания.

- в. Поскольку размер окрашенных серебром областей увеличивается во времени, при слишком длительном окрашивании отдельные AgЯОР-сайты могут сливаться. В результате число AgЯОР, выявленных в интерфазном ядре, может оказаться заниженным. Поэтому очень важно провести предварительное «титрование» срезов или клеточных препаратов, чтобы подобрать оптимальное время реакции.
- г. Применение контрастирования определяется предпочтениями исследователя. В некоторых работах в качестве контрастирующего вещества использовали гемалюм или метиловый зеленый. Однако при такой обработке может произойти маскирование AgЯОР, и обычно при гистологических и цитологических исследованиях контрастирование вообще не применяют. В ходе реакций, использующихся в методе AgЯОР, ядра окрашиваются в оранжевый цвет, что позволяет достаточно легко определять тип клеток.

3. Более редкие методы выявления ЯОР

3.1. Ультраструктурный метод

Фибриллярные центры можно визуализировать с помощью обычной электронной микроскопии: на фотографиях они выглядят как электронопрозрачные области в ядрышках клеток. Кроме этого, благодаря аргирофильной природе их можно выявить на ультраструктурном уровне, как это описано в протоколе 10.3 (рис. 10.5).

Протокол 10.3. Ультраструктурный метод выявления ЯОР на интерфазных хромосомах [13]

Материалы

- 0,1 М фосфатный буфер, pH 6,8
- 1,2–1,8% глутаральдегид в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,8
- Фиксатор Карнуа: этанол/уксусная кислота/хлороформ
- Реактивы для окрашивания (см. протокол 10.2)
- «Ингибисол» (Taab, UK)
- Смола ТААВ ЕМ (Taab, UK)

Методика

1. Измельчают свежую ткань.
2. Фиксируют ее в 1,2–1,8% глутаральдегиде в 0,1 М фосфатном буфере, pH 6,8, в течение 10 мин при 4 °С.
3. Фиксируют в фиксаторе Карнуа в течение 5 мин при 4 °С.
4. Промывают один раз в 70% этаноле и два раза в чистой воде.

Протокол 10.3 (Продолжение)

5. Проводят в затемненном месте стандартную AgЯОР-реакцию в течение 10 мин при 70 °С (см. протокол 10.2).
6. Промывают несколько раз в **чистой** воде.
7. Дегидратируют с использованием серии спиртов возрастающей концентрации (до 100% этанола) и затем промывают два раза по 30 мин 100% этанолом.
8. Промывают два раза по 30 мин в чистом «Ингибисоле».
9. Помещают ткань на ночь в смесь «Ингибисол»:смола ТААВ ЕМ, 50:50.
10. Помещают ткань на 6 ч в смесь «Ингибисол»:смола ТААВ ЕМ, 25:75.
11. Помещают ткань на ночь в чистую смолу ТААВ ЕМ.
12. Заливают ткань смолой и проводят полимеризацию при 70 °С.
13. Готовят срезы и монтируют их на сетках Cu/Rh.
14. Окрашивают срезы в течение 10 мин в растворе уранилацетат/ацетон.
15. Промывают срезы в ацетоне.
16. Окрашивают срезы в течение 10 мин в стандартном растворе цитрата, приготовленном по методу Рейнольдса.
17. Промывают срезы, высушивают и проводят микроскопию.



Рис. 10.5. Аргирофильное окрашивание двух фибриллярных центров.

3.2. Метод, основанный на связывании ионов висмута

Альтернативный метод выявления ЯОР основан на связывании ионов висмута Bi^{3+} с ЯОР-ассоциированными белками с мол. массой 100 кДа (к сожалению, в нем используется токсичный и обладающий неприятным запахом сульфид аммония). По нашим данным [1, 14], этот метод может быть особенно полезен в тех случаях, когда наблюдается высокая фоновая преципитация коллоидного серебра. На рис. 10.6 представлены результаты опыта по связыванию висмута с ЯОР интерфазных хромосом.

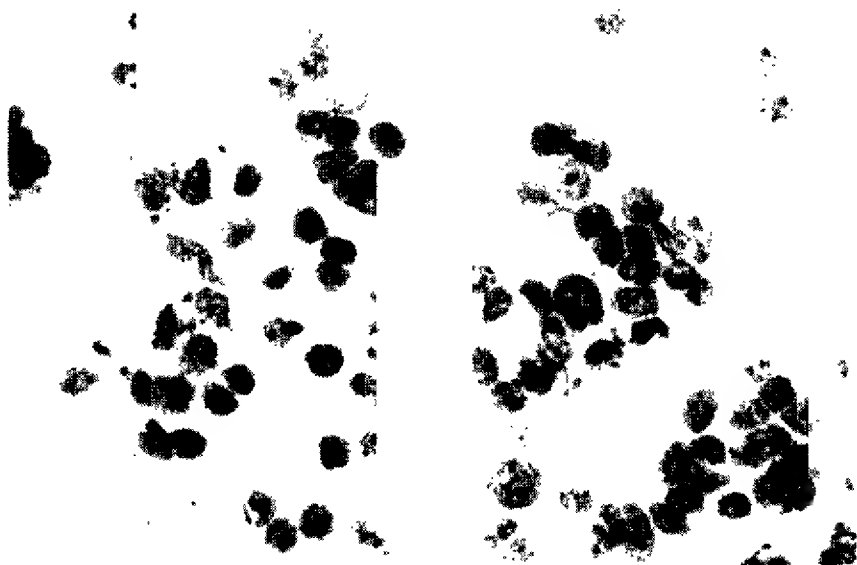


Рис. 10.6. Окрашенные висмутом «интерфазные ЯОР» в лейкозных клетках линии U937.

Протокол 10.4. Выявление ЯОР методом, основанным на связывании висмута

Материалы

- 0,2 М трис- HCl , pH 7,6
- Раствор висмута: к 10 мл 1 М NaOH добавляют 400 мг тартрата натрия и в полученный раствор вносят 200 мг оксинитрата висмута. Добавляют 3,5 объема 0,1 М трис- HCl , pH 7,6, и доводят

Протокол 10.4 (Продолжение)

pH до 7,0, добавляя по каплям 10% HCl. При pH 7,0 раствор становится мутным. После фильтрования раствор можно использовать для окрашивания срезов.

Методика

1. Готовят обычным способом парафиновые срезы толщиной 3 мкм из фиксированной формалином ткани, депарафинируют их и регидратируют в чистой воде.
2. Промывают срезы в 0,2 М трис-HCl, pH 7,6.
3. Окрашивают в растворе висмута в течение 2,5 ч или более.
4. Промывают три раза по 10 мин в 0,1 М трис-HCl, pH 7,6.
5. В вытяжном шкафу промывают срезы 0,1 М трис-HCl, pH 7,6, к которому добавлено несколько капель сульфида аммония.
6. Промывают срезы в чистой воде, дегидратируют их и монтируют на предметные стекла. ЯОР выглядят как черно-коричневые точки.

3.3. Гибридизация in situ

Гибридизация in situ была тем методом, с помощью которого с применением изотопно меченных зондов были впервые выявлены ЯОР [15, 16]. Однако в диагностических целях этот метод практически не применяется: он весьма трудоемкий и не имеет существенных преимуществ (за исключением потенциально более высокой чувствительности) по сравнению с более простым аргирофильным методом. Недавно для выявления на срезах генов рРНК было предложено использовать неизотопный метод детекции, при котором место связывания зонда выявляли на ультраструктурном уровне с помощью мечения золотом ([17]; см. также гл. 3). Для полноты картины в протоколе 10.5 описан типичный метод гибридизации с использованием радиоактивно меченных зондов [18].

Протокол 10.5. Выявление генов рРНК методом гибридизации in situ

Материалы

- Панкреатическая РНКазы А, РНКазы Т1 (Sigma)
- 20 × SSC: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0
- Серия спиртов: 50%, 70%, 95%, 100% этанол (о/о)
- 0,7 М NaOH
- Формамид
- Меченый зонд: суммарная ДНК человека, меченная ^3H с помощью ник-трансляции ([18] и гл. 13)

- Гибридизационный буфер: 50% формамид, $4 \times \text{SSC}$. Доводят pH до 7,0–7,5 с помощью 0,1 М HCl
- Эмульсия Kodak NTB-12
- 5% трихлоруксусная кислота (ТХУ)

Методика

1. Для удаления эндогенной РНК обрабатывают пластинки митотических хромосом РНКазой А (50 мкг/мл), РНКазой Т1 (10 ЕД/мл) в растворе $1 \times \text{SSC}$ при 37 °С в течение 1 ч.
2. Промывают препараты в двух сменах $1 \times \text{SSC}$ при комнатной температуре, по 5 мин в каждой смене.
3. Дегидратируют препараты в серии спиртов с повышением концентрации этанола до 100% и высушивают их на воздухе.
4. Для денатурации хромосомной ДНК обрабатывают препараты в течение 3 мин при 20 °С 0,7 М NaOH, регидратируют их в серии спиртов и высушивают на воздухе.
5. Растворяют меченый зонд ($2-4 \cdot 10^6$ имп./мин) в 0,1 М NaOH и денатурируют его при 20 °С в течение 15 мин.
6. Добавляют такой объем гибридизационного буфера, чтобы радиоактивность аликвоты объемом 30 мкл составляла $60-100 \cdot 10^3$ имп./мин. На каждый препарат наносят 30 мкл разведенного меченого зонда, накрывают его покровным стеклом и инкубируют в атмосфере 50% формамида, $4 \times \text{SSC}$, pH 7,0, в течение ночи (16–20 ч) при 20 °С.
7. Промывают препараты в $1 \times \text{SSC}$ в течение 30 мин при 20 °С и 30 мин при 60 °С.
8. Промывают препараты при 4–5 °С 5% ТХУ, а затем при 20 °С последовательно 70% и 95% этанолом, высушивают на воздухе и в темноте покрывают их нагретой до 45 °С жидкой эмульсией Kodak NTB-2. Проявляют, промывают и анализируют картину распределения зерен серебра (гл. 5 и 7).

3.4. Последовательное применение иммуногистохимических методов и окрашивания Ag

При неоплазиях клеточные популяции разнородны, что затрудняет использование многих методов анализа. Так, в состав лимфом входят в разных соотношениях эндотелиальные клетки, фибробласты, антиген-представляющие клетки и гистиоциты, а карциномы содержат в большом количестве лимфоидные и эндотелиальные клетки. Для более точного подсчета AgЯОР в клетках разного типа, присутствующих в опухолевых срезах, могут ока-

заться полезными иммуногистохимические методы. С их помощью можно идентифицировать (или, наоборот, исключить) какие-то типы клеток и подсчитать AgЯОР в конкретной клеточной популяции. В протоколе 10.6 описан один из таких методов, а рис. 10.7 иллюстрирует его использование. Более полное описание иммуноцитохимических методов дано в гл. 2.

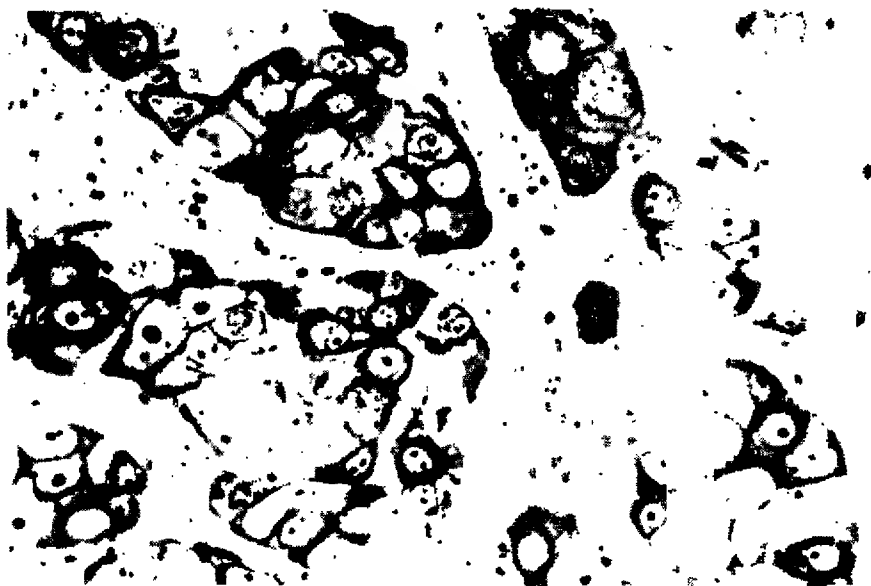


Рис. 10.7. Препарат плоскоклеточной карциномы легких, последовательно окрашенный для выявления цитокератинов иммуноцитохимическими методами с использованием ЩФАЩФ и подсчета AgЯОР. Злокачественные эпителиальные клетки выглядят более светлыми и число AgЯОР в них можно подсчитать отдельно.

Протокол 10.6. Иммуноокрашивание с последующим выявлением ЯОР

1. Используя обычные методы, готовят для проведения иммуногистохимического анализа замороженные срезы толщиной 4 мкм или парафиновые срезы толщиной 2–3 мкм (гл. 2).
2. Подсушивают область вокруг среза, наносят на него разведенную в 0,1 М трис-НСl, рН 7,6, в соотношении 1:5 нормальную сыворотку свиньи (козы, кролика, мыши) и инкубируют препарат при комнатной температуре в течение 10 мин.

3. Аккуратно (не промывая срез) отбирают сыворотку и вместо нее наносят антитела или антисыворотку в оптимальном разведении. Инкубируют 30 мин при комнатной температуре.
4. Промывают в течение 5 мин при комнатной температуре в 50 мМ трис-НСl, рН 7,2, 100 мМ NaCl.
5. Подсушивают область вокруг среза и наносят на него вторые, зависящие от природы первых антител¹⁾, антитела, разведенные в соотношении 1:30 в 0,1 М трис-НСl, рН 7,6. Инкубируют 30 мин при комнатной температуре.
6. Промывают в ТСБ в течение 5 мин при комнатной температуре.
7. Подсушивают область вокруг среза и наносят на него соответствующий (зависящий от природы первых антител)¹⁾ комплекс ЩФАЩФ, разведенный в соотношении 1:100 в ТСБ. Инкубируют 30 мин при комнатной температуре.
8. Промывают в течение 5 мин при комнатной температуре в ТСБ.
9. Для усиления сигнала повторяют пп. 5–8 еще один или два раза (оптимальную степень усиления подбирают опытным путем).
10. Инкубируют срезы в течение 30 мин при комнатной температуре в сосуде Коплина, наполненном приготовленным так, как это описано в гл. 2, и профильтрованным субстратом щелочной фосфатазы — нафтолом AS-BI/быстрым красным TR.
11. Промывают трижды по 5 мин при комнатной температуре в чистой воде.
12. Проводят окрашивание серебром. Время окрашивания подбирают опытным путем (см. протокол 10.2).
13. Монтируют срезы в водной среде.

¹⁾ Обычно в качестве первых антител используют моноклональные мышиные антитела. В связи с этим для последующих обработок нужны кроличьи антитела к иммуноглобулинам мыши и моноклональный ЩФАЩФ-комплекс. При работе с первыми поликлональными кроличьими антителами можно использовать свиные антитела к иммуноглобулинам кролика и поликлональный ЩФАЩФ-комплекс. Хорошие результаты, однако, могут дать и другие методы детекции, когда продукт реакций имеет красную окраску (см. гл. 2).

Как показывает наш опыт, ЩФАЩФ-метод, когда конечный продукт имеет красный цвет, предпочтительнее метода с использованием пероксидаза-3,3'-диаминобензидаина. В последнем случае конечный продукт имеет коричневый цвет и его труднее отличать от «точек» AgЯОР [19].

3.5. Иммуноцитохимическое выявление белков, ассоциированных с ЯОР

Как мы уже говорили, некоторые ассоциированные с ЯОР белки могут быть выявлены как антигены с помощью иммуноцитохимических методов. Этот способ пока не нашел диагностического применения и возможность его использования зависит от наличия соответствующих аутоантител к данным белкам. Более полную информацию об этом можно получить в обзоре [1].

4. Количественное определение AgЯОР на интерфазных хромосомах

Количественное определение ядерных AgЯОР в клетке — не такая простая задача, как это кажется на первый взгляд. Ниже мы рассмотрим два метода ее решения, для которых разработаны теоретические основы. Поскольку в ходе клеточного цикла происходит агрегация и дезагрегация ядрышек, а во время митоза они полностью диспергированы, можно предположить, что подсчет числа AgЯОР позволит судить о пролиферативной активности клеток [1]. В целом это предположение справедливо, однако хорошо известно, что AgЯОР варьируют по форме и размеру [20, 21, 22]: в активно пролиферирующих клетках их размер меньше, чем в клетках с менее активным ростом. И действительно, было показано, что при кожной меланоме и неходжкинской лимфоме определение размера фибриллярного центра позволяет отличить злокачественную меланому от доброкачественной и разграничить высоко- и слабодифференцированную лимфомы.

Разработка любого «нового» метода сталкивается с проблемой стандартизации. Как видно из табл. 10.4, данные разных авторов по количественному определению AgЯОР при различных заболеваниях иногда сильно различаются. Вероятнее всего это связано с применением способов подсчета «точек» AgЯОР и неодинаковой продолжительностью окрашивания. Последнее особенно важно, так как при излишнем увеличении времени окрашивания происходит как бы слияние ЯОР, что приводит к занижению их числа [23]. Более информативным поэтому представляется подсчет индивидуальных фибриллярных центров (как свободных, так и входящих в состав ядрышка), поскольку изменение числа ЯОР соответствует дезагрегации ядрышек и, в свою очередь, полиферативной активности клетки [24]. В связи с этим предлагается проводить «титрование» по времени любого изучаемого образца ткани, с тем чтобы подобрать оптимальные условия для выявления и подсчета внутриядрышковых ЯОР.

Таблица 10.4. Данные по количественному определению AgЯОР, полученные разными авторами

Меланомы кожи						
	Crocker, Skilbeck [25]		Leong, Gilham [26]		Howat et al. [27]	
	Среднее	Диапазон	Среднее	Диапазон	Среднее	Диапазон
Чевус	1,21	0,8–1,6	1,22	0,6–3,3	1,3	1,1–1,6
Злокачественная меланома	7,9	4,2–11,6	9,18	4,6–20,3	2,1	1,2–4,2

Неходжкинская лимфома				
	Crocker, Nar [28]		Kim et al. [29]	
	Среднее	Диапазон	Среднее	Диапазон
Малодифференцированная	1,8	1,0–1,5	1,3	1–4
Высокодифференцированная	5,6	4,4–6,8	Данные отсутствуют	4,2–8,3

Опухоли молочных желез					
	Smith, Crocker [30]		Dervan et al. [31]		Raymond, Leong [32]
	Среднее	Диапазон	Среднее	Диапазон	Среднее Диапазон
Доброкачественная	6,18	3,5–8,0	5,57	2,65–6,8	2,05 0,9–3,6
Злокачественная	12,86	4,9–38,4	13,77	4,6–26,9	5,46 2,4–13,3

4.1. Техника анализа изображений

Хотя с помощью анализатора изображений трудно подсчитать отдельные AgЯОР, недавно эти методы были с успехом применены для выявления некоторых патологий. Анализ основывался на определении *общего количества* окрашенного серебром материала в ядре, а не числа AgЯОР, для чего пришлось существенно улучшить разрешение оттенков серого цвета. Таким способом удалось разграничить доброкачественные и злокачественные неоплазии [33, 34]. Содержание AgЯОР в ядре (C) равно

$$C = N/A,$$

где

$$N = \frac{\sum (\text{AgЯОР})}{\text{Число клеток}},$$

$$A = \frac{\sum (\text{площадь AgЯОР})}{\text{Число AgЯОР}}.$$

Таким образом, описанный в работе [33] метод все же подразумевает подсчет AgЯОР. Было бы интересно проследить за дальнейшим его развитием.

4.2. Размер AgЯОР

В основе еще одного подхода лежит определение размера AgЯОР. Для этого можно использовать световую микроскопию, работая с увеличенными фотографиями и системами интерактивного анализа изображений [21], или проводить анализ на ультраструктурном уровне [20, 22].

5. Применение методов, основанных на анализе интерфазных AgЯОР, в гистопатологии

В гистопатологии эти методы применяются в следующих случаях:

- разграничение неопластических и не-неопластических заболеваний;
- разграничение сильно- и слабодифференцированных неоплазий;
- определение пролиферативной активности клеток.

Наиболее интересные результаты получены в первых двух случаях. Мы уже говорили о том, насколько важны правильная интерпретация результатов и подсчет AgЯОР; этому вопросу посвящено много работ, и продолжают выходить все новые. Следующим этапом должно стать применение AgЯОР-методов в прогностических целях, для обнаружения метастазов и повторно возникающих опухолей. Но даже в том случае, если здесь будут достигнуты большие успехи, проблему канцерогенеза удастся решить только частично. В связи с этим очень важным представляется дальнейшее развитие метода.

Большой интерес представляет применение AgЯОР-методов для определения степени пролиферации клеток. Эти методы достаточно дешевы, дают хорошо воспроизводимые результаты и не требуют специального оборудования. Их легко приспособить для исследования архивных залитых в парафин препаратов. Параллельный анализ тканей с помощью мечення антителами Ki67 [19, 35, 36], проточной цитометрии ДНК [37] и кариотипирования [5] показал, что число AgЯОР действительно коррелирует со степенью пролиферации клеток, а не их плоидностью. Необходимо отметить, однако, что дифференцировка клеток *in vitro* также может сопровождаться изменением числа AgЯОР [38].

Литература

1. Crocker J. (1990). In: Pathology of the nucleus (ed. J. C. E. Underwood), pp. 91–149. Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg.
2. Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D. (1983). Molecular biology of the gene. Garland, New York.
3. Crocker J. Cell proliferation in lymphomas (1992). Blackwell, Oxford.
4. Goessens G., Thiry M., Lepoint A. (1987) In: Chromosomes today, Vol. 9 (ed. A. Stahl, J. M. Lucini, A. M. Vagner-Capodano), pp. 261–71. Allen & Unwin, London.
5. Jan Mohamed R. M., Armstrong S. J., Crocker J., Leyland M. J., Hulten M. A. (1989). J. Pathol., **158**, 3.
6. Rooney D. E., Czepulkowski B. H. (1986). Human cytogenetics: a practical approach. IRL Press, Oxford.
7. Kodama Y., Yoshida M. C., Sasaki M. (1980). Jpn. J. Hum. Biochem., **25**, 229.
8. Chiu K. Y., Luke S. L., Wong K. K. (1989). J. Clin. Pathol., **42**, 992.
9. Coghill G., Grant A., Orrell J. M., Jankowski J., Evans A. T. (1990). J. Clin. Pathol., **43**, 1029.
10. Thiebaut F., Rigaut J. P., Reith A. (1984). Stain Technol., **59**, 181.
11. Rowlands D. C., Crocker J., Ayres J. G. (1990). Histochem. J., **22**, 555.
12. Smith P. J., Skilbeck N. Q., Harrison A., Crocker J. (1988). J. Pathol., **155**, 109.
13. Ploton D., Bobichon H., Adnet J.-J. (1982). Biol. Cell., **43**, 229.
14. Locke M., Huie P. (1977). Tissue Cell., **9**, 347.
15. Ritossa F. M., Spiegelman S. (1965). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **53**, 737.
16. Hsu T. C., Spirito S. E., Pardue M. L. (1975). Chromosoma, **53**, 25.
17. Puvion-Durilleue F., Bachelliere J.-P., Puvion E. (1991). Chromosoma, **100**, 395.
18. Morgan G. T., Macgregor H. C., Coleman A. (1980). Chromosoma, **80**, 309.
19. Murray P. G., Boldy D. A. R., Grocher J., Ayres J. G. (1989). J. Pathol., **159**, 169.
20. Derenzini M., Betts C. M., Ceccarelli C., Eusebi V. (1986). Virchows Archiv. (Cell. Pathol.), **52**, 343.
21. Crocker J., Egan M. J. (1988). J. Pathol., **156**, 233.
22. Goodlad J., Crocker J., Macartney J. C. (1991). J. Pathol., **163**, 223.
23. Egan M. J., Crocker J. (1992). Br. J. Cancer., **65**, 1.
24. Crocker J., Boldy D. A. R., Egan M. J. (1989). J. Pathol., **158**, 185.
25. Crocker J., Skilbeck N. (1987). J. Clin. Pathol., **40**, 885.
26. Leong A. S., Gilham P. (1980). Hum. Pathol., **20**, 257.
27. Howat A. J., Wright A. L., Cotton D. W., Reeve S. (1990). Am. J. Dermatopathol., **12**, 156.
28. Crocker J., Nar P. (1987). J. Pathol., **151**, 111.
29. Kim I., Park S. H., Paik S. Y. (1988). J. Koran Med. Sci., **3**, 99.
30. Smith R., Crocker J. (1988). Histopathology, **12**, 113.
31. Dervan P. A., Gilmartin L. G., Loftus B. M., Carney D. N. (1989). Am. J. Clin. Pathol., **92**, 401.
32. Raymond W. A., Leong A. S. (1989). Hum. Pathol., **20**, 741.
33. Derenzini M., Nardi F., Farabegoli F., Ottinetti A., Roncaroli F., Bussolati G. (1989). Acta Cytol., **33**, 491.
34. Ruschhoff J., Plate K. H., Contractor H., Kern S., Zimmerman R., Thomas C. (1990). J. Pathol., **161**, 113.
35. Hall P. A., Crocker J., Watts A., Stansfeld A. G. (1988). Histopathology, **12**, 373.
36. Jan Mohamed R. M. I., Murray P. G., Crocker J., Leyland M. J. (1990). Clin. Lab. Haematol., **12**, 395.
37. Crocker J., Macartney J. C., Smith P. J. (1988). J. Pathol., **154**, 151.
38. Edwards S., Afford S. J., Crocker J. (1991). Exp. Cell. Res., **194**, 118.

ПРИМЕНЕНИЕ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ В МОЛЕКУЛЯРНОЙ КЛИНИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ

Ричард С. Кампбелл

1. Введение

1.1. Общие принципы проточной цитометрии

Метод проточной цитометрии сформировался за последние 30 лет на основе отдельных опытов по подсчету числа частиц и определению их размеров. В 1965 г. появилось первое сообщение о клеточном сортере, а в 70-х годах стали выпускать приборы, способные измерять интенсивность флуоресценции при двух и более длинах волн и определять сразу несколько клеточных параметров. Интересный исторический обзор развития проточной цитометрии дан в работе [1].

В настоящее время выпускают два основных типа приборов для проточной цитометрии: 1) простые в использовании аппараты, которые могут измерять флуоресценцию при двух и более длинах волн и светорассеяние под углом около 10° (малоугловое прямое рассеяние) и 90° ; 2) большие клеточные сортеры, которые не только измеряют пять и более клеточных или ядерных параметров, но и сортируют частицы с заданным набором этих параметров. Здесь мы не будем обсуждать методы сортировки клеток или технические возможности отдельных моделей проточных цитометров. Детальную информацию по этим вопросам можно найти в книгах [2, 3].

Принципы проточной цитометрии весьма просты. Клетки или ядра по одиночке пересекают сфокусированный световой пучок, обычно лазерный. Свет определенной длины волны возбуждает молекулы флуоресцирующих красителей, связанных с различными клеточными компонентами, при этом может происходить одновременное возбуждение нескольких разных красителей, что позволяет оценивать сразу несколько клеточных параметров. Свет, испускаемый красителями, собирают с помощью системы линз и зеркал и разлагают на компоненты. Световые сигналы детектируют, преобразуют в электрические импульсы и далее в форму, удобную для компьютерной обработки и хранения информации.

Методом проточной цитометрии можно получать самые разные данные: определять содержание в клетке ДНК и РНК, суммарное количество белков и количество специфических белков, узнаваемых моноклональными антителами, исследовать клеточный метаболизм (например, измерять внутриклеточный рН), изучать транспорт ионов кальция и кинетику ферментативных реакций [2, 3]. В этой главе мы остановимся на определении этим методом содержания ДНК как такового или в сочетании с другими клеточными параметрами.

1.2. Измерение содержания ДНК

Это одно из самых простых и распространенных применений проточной цитометрии. Первые ДНК-гистограммы, полученные в 1969 г. [4], позволили четко различить клетки, находящиеся в G1-, S- и G2/M-фазах клеточного цикла. С тех пор появилось множество работ по измерению содержания ДНК в клиническом материале, полученном в основном от больных раком.

Из ДНК-гистограмм можно получить два рода данных. Во-первых, идентифицировать клетки с аномальным содержанием ДНК (рис. 11.1, Б), так называемые анеуплоидные клетки. Во-вторых, определить долю клеток, находящихся в S-фазе (SPF), и оценить степень пролиферации. Как правило, в клеточной популяции с высокой пролиферативной активностью число клеток в S-фазе больше, чем обычно.

2. Приготовление клеточных суспензий

При проточной цитометрии можно сканировать от 100 до нескольких тысяч клеток в секунду, что позволяет очень быстро получить достаточно достоверные результаты. Однако таким способом можно анализировать только очень сильно разбавленные клеточные суспензии. Сбидные ткани необходимо сначала дезагрегировать, что всегда сопровождается нарушением морфологии. Клетки монослоя обычно диспергируют обработкой трипсином в присутствии ЭДТА.

2.1. Дезагрегация свежих сбидных опухолей

Методы дезагрегации клеток можно подразделить на три группы:

- методы, основанные исключительно на механической обработке;
- ферментативные методы;
- методы выделения ядер.

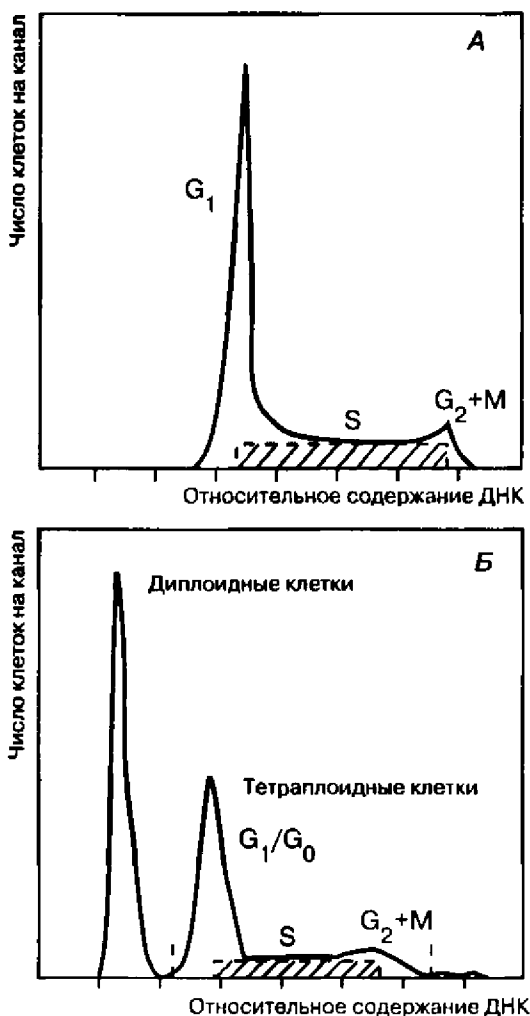


Рис. 11.1. А. ДНК-гистограмма диплоидных клеток. Качество таких гистограмм характеризуется величиной коэффициента вариации (CV) G_1 -пики. Долю клеток в S -фазе вычисляют, вписав прямоугольник в область кривой между G_1 - и G_2 -пики. Б. ДНК-гистограмма тетраплоидных опухолевых клеток. G_1 -пик соответствует клеткам, содержащим вдвое больше ДНК, чем нормальные (индекс ДНК = 2,0).

2.1.1. Механическая дезагрегация

Самые простые и быстрые методы дезагрегации включают только механическую обработку тканей. Один из них описан в протоколе 11.1. Он особенно хорош для рыхлых тканей (например, лимфатических узлов) и позволяет получать густые суспензии клеток солидных опухолей за несколько минут [5, 6]. Если же продавливать через металлическое сито волокнистые ткани, то получится мало клеток и они будут сильно повреждены.

Протокол 11.1. Механическая дезагрегация солидных опухолей

1. Кладут препарат на сеточку из нержавеющей стали с ячейками размером 0,5 мм, помещенную в чашку Петри, и разрезают его на части (1–2 мм³).
2. Увлажняют разрезанный препарат модифицированной средой Игла (МЕМ), содержащей 5% сыворотку плода коровы, и осторожно продавливают через сеточку. Промывают сеточку 4 мл МЕМ.
3. Собирают полученную грубую суспензию шприцем на 5 мл и последовательно пропускают по два раза через иглы №№ 19, 21, 23 и 25¹⁾.
4. Фильтруют суспензию через нейлоновый фильтр с диаметром пор 35 мкм и разводят ее до нужной концентрации.

¹⁾ Можно использовать аспираты, взятые шприцем из солидных опухолей *in situ*.

Для получения неочищенных клеточных суспензий можно использовать аспираты солидных опухолей, взятые с помощью шприца. Эти суспензии затем обрабатывают, как это описано в протоколе 11.1, начиная с п. 3, или используют для выделения ядер (протокол 11.5). Аспираты берут из опухолей *in situ* (например, из опухоли молочной железы [7]) либо из биоптата [8].

2.1.2. Ферментативная дезагрегация

Мы не приводим здесь никаких протоколов для ферментативной дезагрегации тканей, поскольку существует множество разных методов и трудно отдать предпочтение какому-то одному из них; кроме того, у нас самих нет достаточного опыта их использования. Краткое описание этих методов можно найти в работе [9], а процедура дезагрегации с помощью смеси коллагеназы, ДНКазы и трипсина представлена в работах [5, 10]. В этих работах сравниваются также методы механической и ферментативной дезагрегации тканей.

2.1.3. Выделение ядер

Для выделения ядер (обычно из тканей, частично дезагрегированных механическим путем) разработаны разные методы, основанные на использовании ферментов [11], детергентов [12] или тех и других [8]. Детальная процедура дезагрегации тканей, окрашивания препаратов, получения результатов и их анализа для суспензий ядер разработана Винделовом и др. [8]. Метод дезагрегации и окрашивания клеток, предложенный этими авторами, описан в протоколе 11.5 (более подробно об этом см. в гл. 3).

2.1.4. Выбор метода дезагрегации

Цель дезагрегации состоит в получении с высоким выходом суспензии интактных изолированных клеток или ядер, достаточно хорошо соответствующей исходному образцу ткани. Выбор способа дезагрегации зависит от типа ткани, размеров препарата, целей исследования, а также иногда от быстроты и стоимости метода. Относительно простой и недорогой метод механической дезагрегации описан в протоколе 11.1. Он применим в случае лимфоидных тканей, но малопригоден для тканей плотных и волокнистых. Ферментативный метод, предложенный в работах [5, 10], позволяет получить достаточно концентрированную клеточную суспензию из разнообразных опухолей, но при больших затратах времени.

Что же тогда такое — хороший метод дезагрегации? Как показывают наш опыт и литературные данные [7, 8], таковым вполне может быть метод с использованием аспиратов, взятых шприцем. Получаемый при этом частично дезагрегированный препарат гомогенизируют затем так, как это описано в пп. 3–4 протокола 11.1, или выделяют из него ядра [8].

2.2. Суспендирование архивных препаратов, залитых в парафин

Методика исследования ДНК с помощью проточной цитометрии суспензии ядер, полученной из заключенных в парафин архивных препаратов [13], была впервые описана в 1983 г. Мы использовали ее в модифицированном виде (см. протокол 11.2) для анализа самых разнообразных опухолей. Это дает целый ряд преимуществ:

- можно проводить обширные ретроспективные клинические исследования;
- значительно упрощается изучение редко встречающихся патологий;

- парафиновые срезы легко транспортировать, что позволяет проводить цитометрические исследования в специальных центрах.

Недостатки метода состоят в том, что

- качество получаемых результатов, как правило, не очень высокое [13, 14];
- нельзя использовать внутренний ДНК-стандарт.

Протокол 11.2. Суспендирование архивных препаратов, залитых в парафин

1. Помещают срез толщиной 50 мкм в маленькую пронумерованную кассету для биоптатов с диаметром пор 300 мкм.
2. Загружают 12 таких кассет в контейнер и помещают его в специальный аппарат для обработки тканей (например, Histokinette), запрограммированный на встряхивание контейнера по 15 мин в
 - трех сменах ксилола
 - двух сменах 100% спирта
 - двух сменах 90% спирта
 - двух сменах 70% спирта
 - двух сменах 50% спирта

Эти операции можно проводить ночью (весь процесс занимает 2 ч 45 мин).

3. Тщательно промывают контейнер с кассетами в двух сменах дистиллированной воды, по 10 мин в каждой.
 4. Удаляют из кассет воду, аккуратно открывают их и тонким пинцетом переносят депарафинированные срезы в емкость с раствором пепсина, приготовленным следующим образом:
 - 0,5% пепсин (Sigma 7021) в 0,9% NaCl, pH доведен до 1,5 с помощью 2 М HCl.
 5. Переносят партию таких емкостей в водяную баню на 37 °C и инкубируют 30 мин.
 6. Центрифугируют емкости при 800 g в течение 3 мин (обычно 2000 об/мин) при комнатной температуре.
 7. Аккуратно отсасывают супернатант пастеровской пипеткой.
 8. Ресуспенсируют осадок (фрагменты ткани и высвободившиеся ядра) в 2 мл ФСБ и энергично встряхивают.
 9. Фильтруют полученную суспензию через нейлоновый фильтр с диаметром пор 35 мкм и доводят концентрацию ядер до желаемой величины.
-

Качество результатов можно повысить, если немного усовершенствовать фиксацию тканей [15]. Хороший эффект дает фиксация в формалине при нейтральном рН при 4 °С в течение ночи. Следует избегать нагревания ткани (если только оно не является абсолютно необходимым при ее обработке) или неоправданно длительной фиксации. Сравнивая результаты, полученные на свежих и заключенных в парафин тканях лимфатических узлов, мы обнаружили, что их качество, а также индекс ДНК и доля клеток в S-фазе совпадают [6].

3. Окрашивание ДНК

При окрашивании клеточной ДНК с целью последующего определения ее содержания с помощью проточной цитометрии следует учитывать:

- специфичность красителя по отношению к ДНК;
- его спектральные характеристики: интенсивность флуоресценции и возможность ее регистрации имеющимися в продаже приборами;
- стоимость и удобство в работе (растворимость, стабильность и т. д.).

Этим требованиям отвечает целый ряд флуорохромов. Детальное их описание дано в работах [16–18]. Здесь мы остановимся только на окрашивании ДНК с помощью иодистого пропидия (ИП), который используется в проточной цитометрии чаще других флуорохромов даже несмотря на то, что он не строго специфичен по отношению к ДНК. С помощью ИП можно окрашивать также двухцепочечную РНК. Спектральные характеристики ИП очень удобны для проточной цитометрии: для возбуждения флуоресценции используется обычный аргоновый лазер с рабочей длиной волны 488 нм, а максимум флуоресценции находится вблизи 620 нм, что позволяет параллельно использовать флуоресцеин при проведении многопараметрических измерений (разд. 5).

Независимо от красителя последний должен находиться с ДНК в стехиометрических соотношениях, т.е. количество связанного с ДНК красителя должно быть пропорционально содержанию ДНК в клетке. Чтобы красителем были заняты все доступные для связывания места, его следует брать в некотором избытке.

Большинство флуоресцирующих красителей, связывающихся с ДНК, в том числе и ИП, не могут проходить через мембраны intactных клеток. Чтобы повысить проницаемость мембран, клетки либо фиксируют спиртом, либо обрабатывают детергентами.

3.1. Использование другой ДНК в качестве стандарта

Содержание ДНК, которой отвечает один из пиков на ДНК-гистограмме для исследуемого препарата, можно оценить, сравнив этот пик с пиком для другой ДНК, содержание которой известно. Так, сравнение левого пика на рис. 11.1 с пиком, отвечающим ДНК диплоидных лимфоцитов периферической крови человека, говорит о том, что мы имеем дело с диплоидными клетками. В докладе Комитета по номенклатуре в аналитической цитометрии [19] рекомендуется использовать лимфоциты в качестве независимого стандарта ДНК (см. протокол 11.3). Известны и другие случаи, когда стандартом служат ядерные эритроциты немлекопитающих, а других животных [8]. Соответствующий метод сравнения описан в протоколе 11.5.

Если используются ядра, выделенные из заключенных в парафин препаратов, то независимые ДНК-стандарты применять нельзя [13, 20]. Это связано с неодинаковым окрашиванием ДНК в ядрах, выделенных из разных парафиновых блоков, вследствие различий в процедурах фиксации и обработки тканей. Если на ДНК-гистограммах препаратов, заключенных в парафин, наблюдаются два G_1 -пики, то левый из них условно считается соответствующим диплоидным клеткам (рис. 11.1, Б). Это не мешает выявлению анеуплоидных клеток, поскольку все образцы содержат внутренний контроль — диплоидные клетки (лимфоциты, эндотелиальные клетки и т. д.). Но в результате некоторые образцы ошибочно классифицируются как «гиперплоидные», хотя на самом деле являются «гипоплоидными». Клиническая значимость такой неправильной классификации неизвестна, но в любом случае ее вероятность невелика.

3.2. Методы окрашивания ДНК

3.2.1. Простой метод окрашивания свежеполученных клеток

Эту процедуру, описанную в протоколе 11.3, можно объединить с дезагрегацией солидных опухолей, описанной в протоколе 11.1, что позволяет получить результаты всего за один час. Описанным методом можно окрашивать клетки в культуре, одноядерные клетки периферической крови и другие типы обособленных клеток. В процедуре, описанной в протоколе 11.3, в качестве независимого ДНК-стандарта используется ДНК лимфоцитов, что дает возможность установить ploidy клеток, которым отвечают пики на ДНК-гистограмме анализируемого препарата. Положение пика

3.2.2. Окрашивание ДНК в клетках, фиксированных спиртом, и в ядрах, выделенных из парафиновых блоков

Довольно часто материал, который предполагается исследовать методом проточной цитометрии, должен храниться какое-то время, и чтобы обеспечить его целостность, его фиксируют или замораживают [8]. Обычно для фиксации клеток, ДНК которых затем предполагается окрашивать, используют этанол.

В протоколе 11.4 описана простая процедура фиксации и окрашивания клеток, которую можно сочетать с дезагрегацией (протокол 11.1). Как правило, качество получаемых после этого ДНК-гистограмм немного ухудшается, а кроме того, могут возникнуть проблемы, связанные с агрегацией клеток. Агрегацию можно уменьшить, проводя фиксацию в точном соответствии с протоколом 11.4, а для улучшения качества гистограмм клетки лучше фиксировать в забуференном этаноле [21].

Протокол 11.4. Простой метод фиксации клеток в этаноле и окрашивания ДНК

1. В пластиковые центрифужные пробирки вносят примерно по $4 \cdot 10^5$ клеток, суспендированных в какой-либо среде (например, RPMI 1640 или MEM) или в ФСБ (10 мМ фосфат натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,2).
 2. Содержимое пробирок центрифугируют при 250 g в течение 10 мин при 4 °C, затем ресуспендируют осадок в 2 мл ФСБ и еще раз центрифугируют.
 3. Ресуспендируют каждую аликвоту в 0,4 мл ФСБ и дважды продавливают суспензию через шприц с иглой № 25, чтобы дезагрегировать сгустки. При непрерывном помешивании добавляют по каплям 3,6 мл охлажденного 70% этанола.
 4. Фиксируют клетки не менее 30 мин при 4 °C (такой препарат может храниться несколько недель).
 5. Осаждают клетки центрифугированием при 250 g в течение 10 мин при 4 °C, затем сливают этанол и промывают осадок в ФСБ.
 6. Окрашивают клетки ИП и пропускают через проточный цитометр, как это описано в пп. 4–7 протокола 11.3 (клетки, фиксированные спиртом, обрабатывать тритоном X-100 не нужно).
-

3.2.2. Окрашивание ДНК в клетках, фиксированных спиртом, и в ядрах, выделенных из парафиновых блоков

Довольно часто материал, который предполагается исследовать методом проточной цитометрии, должен храниться какое-то время, и чтобы обеспечить его целостность, его фиксируют или замораживают [8]. Обычно для фиксации клеток, ДНК которых затем предполагается окрашивать, используют этанол.

В протоколе 11.4 описана простая процедура фиксации и окрашивания клеток, которую можно сочетать с дезагрегацией (протокол 11.1). Как правило, качество получаемых после этого ДНК-гистограмм немного ухудшается, а кроме того, могут возникнуть проблемы, связанные с агрегацией клеток. Агрегацию можно уменьшить, проводя фиксацию в точном соответствии с протоколом 11.4, а для улучшения качества гистограмм клетки лучше фиксировать в забуференном этаноле [21].

Протокол 11.4. Простой метод фиксации клеток в этаноле и окрашивания ДНК

1. В пластиковые центрифужные пробирки вносят примерно по $4 \cdot 10^5$ клеток, суспендированных в какой-либо среде (например, RPMI 1640 или MEM) или в ФСБ (10 мМ фосфат натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,2).
 2. Содержимое пробирок центрифугируют при 250 g в течение 10 мин при 4 °C, затем ресуспендируют осадок в 2 мл ФСБ и еще раз центрифугируют.
 3. Ресуспендируют каждую аликвоту в 0,4 мл ФСБ и дважды продавливают суспензию через шприц с иглой № 25, чтобы дезагрегировать сгустки. При непрерывном помешивании добавляют по каплям 3,6 мл охлажденного 70% этанола.
 4. Фиксируют клетки не менее 30 мин при 4 °C (такой препарат может храниться несколько недель).
 5. Осаждают клетки центрифугированием при 250 g в течение 10 мин при 4 °C, затем сливают этанол и промывают осадок в ФСБ.
 6. Окрашивают клетки ИП и пропускают через проточный цитометр, как это описано в пп. 4–7 протокола 11.3 (клетки, фиксированные спиртом, обрабатывать тритоном X-100 не нужно).
-

3.2.3. Выделение ядер

В протоколе 11.5 описана методика исследования клинических препаратов с помощью проточной цитометрии изолированных ядер, позволяющая быстро получать качественные результаты [8].

Протокол 11.5. Выделение ядер (приготовление растворов А, В и С подробно описано в работе [8])

1. Используют клетки либо из аспиратов, взятых из опухолей *in situ* и суспендированных шприцем, либо из биоптатов, полученных при хирургических операциях.
2. К суспензии, содержащей примерно 10^6 клеток в 200 мкл цитратного буфера, добавляют эритроциты курицы или форели.
3. Добавляют 1,8 мл раствора А, содержащего трипсин, и перемешивают содержимое пробирки, несколько раз переворачивая ее. Оставляют на 10 мин при комнатной температуре, перемешивая еще 2–3 раза.
4. Добавляют 1,5 мл раствора В, содержащего ингибитор трипсина и РНКазу, перемешивают и оставляют при комнатной температуре еще на 10 мин.
5. Добавляют 1,5 мл охлажденного во льду раствора С, содержащего ИП и гидрохлорид спермина. Перемешивают эту смесь и профильтровывают ее через нейлоновую сетку с диаметром ячеек 25 мкм в пластиковые пробирки, защищенные от света.
6. Инкубируют во льду от 15 мин до 3 ч.
7. Пропускают ядра через проточный цитометр, как это описано в п. 7 протокола 11.3.

Этот метод непригоден для одновременного определения содержания ДНК и поверхностных или цитоплазматических антигенов (см. разд. 5).

4. Проточная цитометрия

В продаже имеются разные проточные цитометры, и изложить общие принципы работы на них невозможно. Какую-то информацию по этому поводу можно найти в специальной литературе (см. например, [1, 2]), но чтобы ближе познакомиться с работой того или иного прибора, лучше записаться на курсы, которые организуют фирмы-производители, или посетить лаборатории, в которых занимаются проточной цитометрией. Отметим лишь несколько моментов, общих для всех приборов:

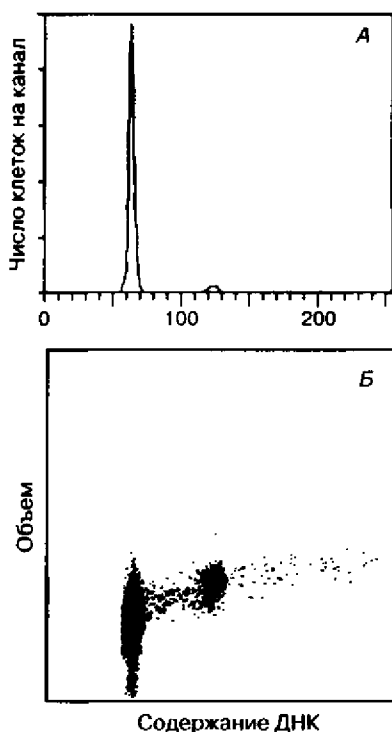


Рис. 11.2. А. ДНК-гистограмма клеток опухоли молочной железы. Пик, соответствующий тетраплоидным клеткам, едва различим. Б. Измерение количества ДНК в объеме позволяет четко различить клетки, находящиеся в S- и G_2/M -фазах.

- для анализа необходимы гомогенные суспензии изолированных клеток;
- клетки или ядра должны иметься в достаточном количестве;
- для устранения эффектов, связанных с возможной агрегацией клеток, необходимо использовать всю доступную информацию, например данные по рассеянию света в объеме (рис. 11.2) и отношение площади пика к его ширине [22].

4.1. Анализ ДНК-гистограмм

В литературе описано множество способов анализа ДНК-гистограмм, подчас противоречащих друг другу [22, 23]. Стандартизировать эти методы попытался Международный комитет по

аналитической цитометрии [19], и тем не менее для анализа ДНК-гистограмм продолжают использовать различные подходы, часто с привлечением разных компьютерных программ. Мы остановимся на тех из них, которые применяются в нашей лаборатории.

4.1.2. Вычисление коэффициента вариации (CV)

Самый простой способ оценки качества результатов основан на вычислении CV для G_1 -пика ДНК диплоидных клеток. Эта величина определяется из приведенного ниже соотношения в предположении, что G_1 -пик следует нормальному распределению:

$$CV = W / (M \cdot 2,35),$$

где W — ширина пика на уровне полувысоты, M — номер канала для максимума G_1 -пика.

Чем меньше CV и чем лучше G_1 -пик отвечает нормальному распределению, тем качественнее результаты. В действительности качество ДНК-гистограмм, как правило, не очень высоко, и чтобы судить о достоверности результатов, полученных при клинических исследованиях, приходится оценивать средний CV и диапазон его значений.

4.1.3. Вычисление индекса ДНК

Рассмотрим общие принципы, на которых основаны идентификация анеуплоидных ядер и вычисление индекса ДНК (ИД). Индекс ДНК для «анеуплоидного» пика (пиков) на гистограммах с двумя или более G_1 -пиками (рис. 11.1, Б) вычисляют, ориентируясь на «диплоидный» G_1 -пик. Так, на рис. 11.1, Б G_1 -пику для опухолевых клеток соответствует вдвое большее количество ДНК, чем G_1 -пику диплоидных клеток, поэтому индекс ДНК для него равен 2,0. Для анеуплоидных клеток, содержащих на 50% больше ДНК, чем нормальные, индекс равен 1,5. Анеуплоидию можно выявить только в тех случаях, когда на гистограммах имеется не менее двух G_1 -пиков. Чтобы установить, какой из близко расположенных друг к другу G_1 -пиков соответствует диплоидным клеткам из свежих образцов ткани, можно использовать внешний ДНК-стандарт (разд. 3.1). Если присутствуют только диплоидные клетки, то ИД считают равным 1,0.

Основная проблема при определении плоидности связана с трудностью выявления малого числа анеуплоидных стволовых клеток. Еще труднее идентифицировать малочисленные тетра-

плоидные стволовые клетки, поскольку такие клетки в G_1 -фазе по содержанию ДНК равноценны диплоидным клеткам в фазе G_2 . Так, в отличие от рис. 11.1,Б, на котором четко виден высокий «тетраплоидный» пик, на рис. 11.2,А обнаруживается лишь слабый пик, соответствующий четырем гаплоидным наборам ДНК. Отвечает ли он тетраплоидным клеткам или диплоидным, находящимся в фазе G_2 , плюс, возможно, клеткам, образующим кластеры? Во многих работах такие случаи различают, определяя долю клеток в указанном пике. Однако лучше использовать другие цитометрические параметры, которые могут регистрироваться большинством проточных цитометров, например светорассеяние или объем Коултера (рис. 11.2,Б). На рис. 11.2,Б четко различимы тетраплоидные клетки в S- и G_1 -фазах и нет никаких признаков образования кластеров.

4.1.4. Определение доли клеток, находящихся в S-фазе

Для определения доли клеток в S-фазе мы использовали метод Байсха и др. [24], модифицировав его применительно к анеуплоидным клеткам [6]. Суть метода состоит в построении прямоугольника, вписывающегося в пространство между G_1 - и G_2 -пиками (рис. 11.1,А). Высота этого прямоугольника определяется числом клеток, приходящихся на 10 центральных каналов области S-фазы, из которого вычисляется среднее число клеток на канал. Аналогичным способом можно определить долю анеуплоидных клеток в S-фазе при условии, что высоту прямоугольника (рис. 11.1,Б) можно вычислить, используя ту часть гистограммы, которая не перекрывается с областью, отвечающей диплоидным клеткам.

5. Мультипараметрические измерения

Используя одновременно несколько флуоресцентных зондов, мы значительно расширяем возможности проточной цитометрии [1, 2]. Но может ли это иметь какие-либо последствия для практического применения данного метода в клинике? Можно привести по крайней мере один пример, когда определение содержания ДНК и РНК оказывается весьма полезным: речь идет о цитологическом исследовании мочевого пузыря [25]. Здесь мы ограничимся лишь кратким описанием метода одновременного определения содержания ДНК и поверхностных антигенов с помощью антител, меченных флуорохромами.

5.1. Одновременное определение содержания ДНК и поверхностных антигенов

Процедура одновременного определения содержания ДНК и поверхностных антигенов приведена в протоколе 11.6. Как и в других случаях, когда используется окрашивание антител, необходимы отрицательный и положительный контроли, а истинную концентрацию антител для конкретных случаев можно определить титрованием ([26]; гл. 2).

Протокол 11.6. Одновременное определение содержания ДНК и поверхностных антигенов

1. Готовят клеточную суспензию в концентрации $5 \cdot 10^6$ клетка/мл в МСИ, содержащей 5% сыворотку плода коровы (МЕМ/5% СПК). Разливают в нужное число пробирок.
2. Инкубируют пробирки во льду в течение 30 мин (эта операция необязательна, но она может уменьшить неспецифическое связывание антител).
3. Разводят до нужной концентрации моноклональные антитела к определяемому антигену, добавляют их в пробирку, доводят объем до 200 мкл и инкубируют смесь во льду в течение 30 мин.
4. Осаждают клетки центрифугированием при 250 g и 4 °C в течение 5 мин и промывают осадок в МЕМ/5% СПК.
5. Ресуспендируют клетки в 500 мкл МЕМ/5% СПК, содержащей в нужной концентрации вторые антитела к F(ab)₂, связанные с флуоресцеином (например, кроличьи антитела к белкам мыши).
6. Хорошо перемешивают и инкубируют 30 мин во льду.
7. Осаждают клетки при 250 g и 4 °C в течение 5 мин и дважды промывают осадок в МЕМ (без сыворотки). Фиксируют клетки спиртом, как это описано в протоколе 11.4.
8. Осаждают клетки при 800 g в течение 3 мин и дважды промывают их в ФСБ (протокол 11.4).
9. Ресуспендируют клетки в 2 мл ФСБ, к которому добавлены ИП до конечной концентрации 50 мкг/мл и РНКаза до конечной концентрации 200 мкг/мл. Для окрашивания ДНК инкубируют смесь в течение 30 мин при комнатной температуре.
10. Дважды пропускают эту суспензию через шприц с иглой № 25.
11. Пропускают не менее 10 000 клеток через проточный цитометр, регистрируя флуоресценцию в красной (ИП) и зеленой (ФИТЦ) областях и измеряя светорассеяние в прямом направлении и под прямым углом.

Этот метод можно использовать, например, для обнаружения антигена, синтезирующегося на определенной стадии клеточного цикла, а также для получения ДНК-гистограмм опухолевых клеток, не загрязненных нормальными клетками. Такой подход успешно применялся при исследовании неходжкинской лимфомы [27].

5.2. Определение содержания ДНК и включения бромурацилдезоксирибозид (БУДР)

Благодаря способности клеток, находящихся в S-фазе, включать в ДНК аналог тимидина бромурацилдезоксирибозид эти клетки можно пометить аналогично тому, как это делается с помощью ^3H -тимидина. Получены моноклональные антитела, которые связываются с БУДР-ДНК [28], что позволяет идентифицировать соответствующие клетки как с помощью проточной цитометрии, так и иммуноцитохимическими методами. В протоколе 11.7 описана процедура окрашивания ДНК для культур клеток, но ее можно использовать с небольшими модификациями и в случае биоптатов опухолей [29]. Больным вводят нетоксичные дозы БУДР и через несколько часов делают биопсию, а затем определяют скорость прохождения клеточного цикла и уровень мечения. Этот метод позволяет получить достоверную информацию о кинетике популяций опухолевых клеток [29].

Протокол 11.7. Окрашивание ДНК, содержащей БУДР

Материалы

- 10 мкМ БУДР в культуральной среде
- 1 М HCl
- Раствор для промывания клеток: ФСБ, содержащий 0,5% твин-20 и 0,5% сыворотку кролика
- Моноклональные антитела к БУДР (Becton Dickinson, UK) и меченные флуоресцеином кроличьи антитела к фрагменту F(ab)₂ иммуноглобулинов мыши (Dakopatts, UK)
- Окрашивающий раствор: 250 мкг/мл ИП, 1 мг/мл РНКазы в дистиллированной воде.

Методика

1. Инкубируют клетки в 10 мкМ БУДР 20–30 мин при 37 °C.
2. Подсчитывают клетки, разделяют их на две порции по $2 \cdot 10^6$ клеток и промывают в ФСБ.

Протокол 11.7 (Продолжение)

3. Фиксируют клетки в 70% этаноле, как описано в пп. 3–5 протокола 11.4.
4. Осаждают фиксированные клетки при 800 g 5 мин.
5. Удаляют супернатант и ресуспендируют клетки в 2 мл 1 М HCl, хорошо перемешивая встряхиванием.
6. Инкубируют суспензию при 37 °C 20 мин.
7. Осаждают клетки при 800 g в течение 5 мин и дважды промывают их в ФСБ.
8. Добавляют 1 мл промывающего раствора, встряхивают, инкубируют 15 мин при комнатной температуре.
9. Осаждают клетки при 800 g в течение 5 мин, удаляют супернатант и ресуспендируют осадок в 0,5 мл промывающего раствора, содержащего 20 мкл моноклональных антител к БУДР, инкубируют смесь 30 мин.
10. Осаждают клетки при 800 g в течение 5 мин и промывают их промывающим раствором.
11. Ресуспендируют клетки в 0,5 мл промывающего раствора, содержащего 20 мкл меченных флуоресцеином кроличьих антител к фрагменту F(ab)₂ иммуноглобулинов мыши. Хорошо перемешивают и инкубируют 30 мин при комнатной температуре.
12. Осаждают клетки при 800 g в течение 5 мин и промывают их в ФСБ.
13. Ресуспендируют клетки в 1 мл ФСБ и осторожно пропускают суспензию через шприц с иглой № 25 (на этой стадии клетки могут быть хрупкими).
14. Добавляют 0,25 мл окрашивающего раствора: ИП в концентрации 50 мкг/мл и РНКаза в концентрации 200 мкг/мл.
15. Окрашивают не менее чем за 30 мин до проточной цитометрии.
16. Пропускают не менее 10 000 клеток через проточный цитометр, регистрирующий флуоресценцию в красной (ИП) и зеленой (флуоресцеин) областях и светорассеяние.

5.3. Одновременное определение содержания ДНК и ядерных или цитоплазматических антигенов

Прежде чем подвергать клетки иммуномечению, необходимо обеспечить их проницаемость для соответствующих антител. Для этого клетки обрабатывают детергентами или фиксируют спир-

том. Методика окрашивания клеточных антигенов описана в протоколе 11.8. Сходная процедура применялась для окрашивания белка D5, родственного рецептору эстрогена [22], и ядерного белка p53.

Протокол 11.8. Одновременное определение содержания ДНК и цитоплазматических или ядерных маркеров¹⁾

1. Фиксируют клетки в спирте, как описано в протоколе 11.4.
2. Дважды промывают их в ФСБ и ресуспендируют в 300 мкл ФСБ.
3. Добавляют первые антитела, разведенные до нужной концентрации в объеме 200 мкл, и инкубируют смесь во льду 30 мин.
4. Осаждают клетки центрифугированием при 800 g 5 мин и дважды промывают осадок в ФСБ.
5. Ресуспендируют клетки в 0,5 мл ФСБ, содержащем в нужной концентрации фрагмент F(ab)₂ вторых антител, связанных с флуоресцеином (например, кроличьих антител к иммуноглобулинам мыши), и инкубируют 30 мин во льду.
6. Осаждают клетки центрифугированием при 800 g 5 мин и дважды промывают осадок ФСБ.
7. Окрашивают клетки ИП и пропускают через цитометр, как это описано в протоколе 11.7.

¹⁾ Этот метод не обязательно применим ко всем без исключения антигенам (разд. 5.3).

Ясно, что абсолютно все цитоплазматические и ядерные антигены нельзя пометить одним способом. Некоторые из них при обработке клеток разрушаются или переходят в раствор. Например, меченный Ki-67 ядерный белок, родственный пролиферативным белкам, при спиртовой фиксации клеток утрачивается. Как показывает наш опыт, для оптимизации мечения Ki-67 следует инкубировать с антителами нефиксированные клетки (протокол 11.8, п. 3) в присутствии детергента в низкой концентрации (0,1% нонидет Р-40). Получаемые при этом результаты представлены на рис. 11.3. Когда простые методы окрашивания, подобные описанному в протоколе 11.8, не дают результата, процедуру окрашивания конкретных цитоплазматических или ядерных антигенов приходится разрабатывать специально [30, 31].

Иногда ДНК и ядерные антигены удастся окрасить, выделив ядра из парафиновых срезов. В качестве примера можно привести

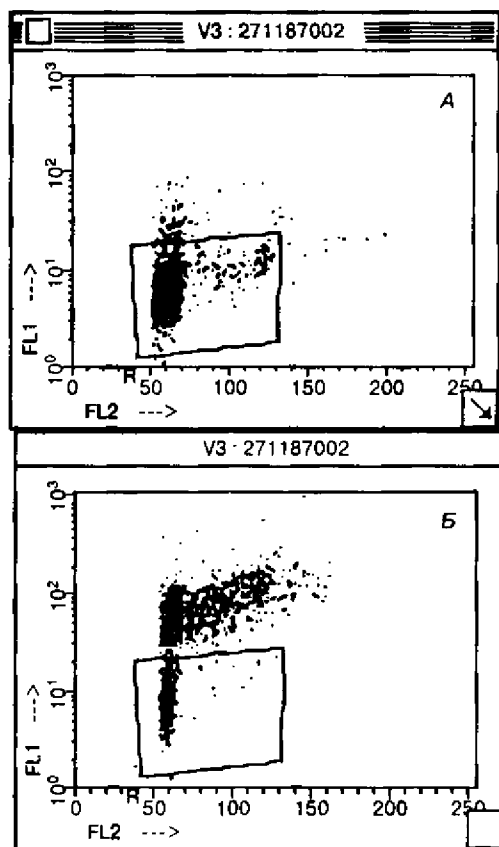


Рис. 11.3. Окрашивание с помощью Ki-67 лимфоцитов периферической крови, культивированных в течение 3 сут в присутствии фитогемагглютина (Б) или без него (А). Рамкой отмечен отрицательный контроль. В случае А окрашивается менее 5% клеток, в случае Б — 70% (ось ординат). По оси абсцисс отложено содержание ДНК.

белковый продукт гена *c-myc* [30], когда выделенные ядра (протокол 11.2) окрашивались в соответствии с пп. 2—7 протокола 11.8 [30]. Однако к интерпретации результатов, полученных таким способом, следует подходить с осторожностью, поскольку при манипуляциях с клетками могут происходить деградация и/или перераспределение белков [32].

6. Применение проточной цитометрии в клинической диагностике

6.1. Определение содержания ДНК

На первых порах основным стимулом к развитию проточной цитометрии послужило желание автоматизировать цитологические методы, использующиеся для диагноза заболеваний [25], но большинство опубликованных к настоящему времени работ посвящено применению этого метода для прогностических целей. Так, установлено, что опухоли, для которых характерны анеуплоидия и наличие большого числа клеток в S-фазе, более агрессивны, и прогноз для больных с такими опухолями хуже [33–36].

В качестве примера ситуации, когда цитометрия помогает получить очень ценную информацию, дополняющую стандартные гистопатологические данные, можно привести дифференциальную диагностику разных подтипов диффузной формы рака молочной железы. Среди больных с такой формой рака имеется подгруппа, для которой выживаемость намного ниже, и им целесообразно назначение дополнительной химиотерапии. Чтобы выявить таких

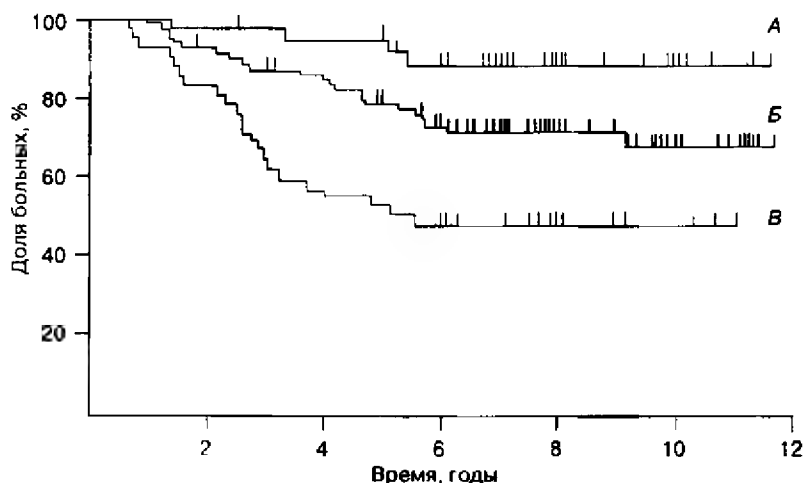


Рис. 11.4. Доля больных диффузной формой рака молочной железы, проживших без рецидивов (по данным O'Reilly et al. [37]). А. Размер опухоли < 1,0 см, небольшая доля клеток в S-фазе. Б. Размер опухоли > 1,0 см, небольшая доля клеток в S-фазе. В. Размер опухоли > 1,0 см, большая доля клеток в S-фазе.

больных, мы попытались использовать проточную цитометрию [37]. Как видно из рис. 11.4, у больных с плохим прогнозом опухоль имеет больший размер и большая доля клеток находится в S-фазе.

6.2. Одновременное определение содержания ДНК и клеточных антигенов

Одно из преимуществ проточной цитометрии заключается в том, что она позволяет одновременно определять несколько клеточных параметров. Мы уже упоминали об идентификации опухолевых и нормальных клеток с помощью меченых поверхностных клеточных антигенов [27]. Аналогичным образом, проводя мечение цитоплазматических антигенов одновременно с окрашиванием ДНК, можно диагностировать, например, рак прямой кишки [38].

Однако мультипараметрическая проточная цитометрия может дать клинической диагностике гораздо больше, чем возможность разграничения нормальных и опухолевых клеток. Например, метод включения БУДР ([29]; разд. 5.2) может использоваться для выявления больных раком, нуждающихся в интенсивной лучевой терапии [39]. Большой интерес представляет одновременное определение содержания различных ассоциированных с пролиферацией ядерных белков, например p53, PCNA, c-myc и антигена Ki-67 [30, 31]. Оценка пролиферации полезна и сама по себе, а одновременное количественное определение ДНК может представлять не только научный, но и практический интерес.

Литература

1. Melamed M. R., Mullaney P. F., Shapiro H. M. (1990). In: Flow cytometry and sorting (2nd edn.) (ed. M. R. Melamed, T. Lindmo and M. L. Mendelsohn), pp. 1–9. Wiley-Liss, New York.
2. Ormerod M. G. (ed.) (1990). Flow cytometry; A practical approach. IRL Press, Oxford.
3. Melamed M. R., Lindmo T., Mendelsohn M. L. (ed.) Flow cytometry and sorting (2nd edn.), Wiley-Liss, New York.
4. Van Dilla M. A., Trujillo T. T., Mullaney P. F., Coulter J. R. (1969). Science, **163**, 1213.
5. Ensley J. F., Maciorowski Z., Pietraskiewicz H., Hassan M., Kish J., Al-Sarraf M. et al. (1987). Cytometry, **8**, 488.
6. Campelejohn R. S., Macartney J. C., Morris R. W. (1989). Cytometry, **10**, 410.
7. Levack P. A., Mullen P., Anderson T. J., Miller W. R., Forrest A. P. M. (1987). Br. J. Cancer, **56**, 643.
8. Vindelov L. L., Christensen J. J. (1990). Cytometry, **11**, 753.
9. Pallavichini M. G., Taylor I. W., Vindelov L. L. In: Flow cytometry and sorting (2nd edn.) (ed. M. R. Melamed, T. Lindmo and M. L. Mendelsohn), pp. 187–194. Wiley-Liss, New York.

10. Ensley J. F., Maciorowski Z., Pietraszkewicz H., Klemic G., KuKuruga M., Sapareto S. et al. (1987). *Cytometry*, **8**, 479.
11. Beck H. P. (1977). *Cell Tissue Kinet.*, **10**, 265.
12. Petersen S. E. (1985). *Cytometry*, **6**, 452.
13. Hedley D. W., Friedlander M. L., Taylor I. W., Rugg C. A., Musgrove E. A. (1983). *J. Histochem. Cytochem.*, **31**, 1333.
14. Kallioniemi O. P. (1988). *Cytometry*, **9**, 164.
15. Gillett C. E., Camplejohn R. S., O'Reilly S. M. (1990). *J. Pathol.*, **160**, 173A.
16. Waggoner A. S. (1990). In: *Flow cytometry and sorting* (2nd edn.) (ed. M. R. Melamed, T. Lindmo and M. L. Mendelsohn), pp. 209–225. Wiley-Liss, New York.
17. Crissman H. A., Steinkamp J. A. (1990). In: *Flow cytometry and sorting* (2nd edn.) (ed. M. R. Melamed, T. Lindmo and M. L. Mendelsohn), pp. 227–247. Wiley-Liss, New York.
18. Laff S. A., Langolis R. J. (1990). In: *Flow cytometry and sorting* (2nd edn.) (ed. M. R. Melamed, T. Lindmo and M. L. Mendelsohn), pp. 249–290. Wiley-Liss, New York.
19. Hoddeaman W., Schumann J., Andreoff M., Barlogie B., Herman C. J., Lief R. C. et al. (1984). *Cytometry*, **5**, 445.
20. Schutte B., Reynders M. M. J., Bosmann F. T., Blijham G. H. (1985). *Cytometry*, **6**, 26.
21. Alanen K. A., Klemi P. J., Taimela S., Joensuu H. (1989). *Cytometry*, **10**, 86.
22. Ormerod M. G. (1990). In: *Flow cytometry: a practical approach* (ed. M. G. Ormerod), pp. 69–87. IRL Press, Oxford.
23. Dean P. N. (1990). In: *Flow cytometry and sorting* (2nd edn.) (ed. M. R. Melamed, T. Lindmo and M. L. Mendelsohn), pp. 415–444. Wiley-Liss, New York.
24. Baisch H., Gohde W., Linden W. A. (1975). *Radiat. Environ. Biophys.*, **12**, 31.
25. Melamed M. R., Staiano-Coico L. (1990). In: *Flow cytometry and sorting* (2nd edn.) (ed. M. R. Melamed, T. Lindmo and M. L. Mendelsohn) Wiley-Liss, New York.
26. Carter N. P. (1990). In: *Flow cytometry: a practical approach* (ed. M. G. Ormerod), pp. 45–67. IRL Press, Oxford.
27. Braylan R. C., Benson N. A., Nourse V. A. (1984). *Cancer Res.*, **44**, 5010.
28. Dolbeare F., Gatzner H., Pallavicini M. G., Gray J. W. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5573.
29. McNally N. J., Wilson G. D. (1990). In: *Flow cytometry: a practical approach* (ed. M. G. Ormerod), pp. 87–104. IRL Press, Oxford.
30. Watson J. V. (1990). In: *Flow cytometry: a practical approach*, pp. 209–228. IRL Press, Oxford.
31. Darzynkiewicz Z. (1990). In: *Flow cytometry and sorting* (2nd edn.) (ed. M. R. Melamed, T. Lindmo and M. L. Mendelsohn), pp. 315–340. Wiley-Liss, New York.
32. Lincoln S. T., Bauer K. D. (1989). *Cytometry*, **10**, 456.
33. Friedlander M. L., Hendley D. W., Taylor I. W. (1984). *J. Clin. Pathol.*, **37**, 961.
34. Hedley D. W. (1989). *Cytometry*, **10**, 229.
35. Merkel D. E., McGuire W. L. (1990). *Cancer*, **65**, 1194.
36. Macartney J. C., Camplejohn R. S. (1990). *Eur. J. Cancer*, **26**, 635.
37. O'Reilly S. M., Camplejohn R. S., Barnes D. M., Mills R. R., Rubens R. D., Richards M. A. (1990). *J. Clin. Oncol.*, **8**, 2040.
38. Crissman J. D., Zarbo R. J., Ma C. K., Visscher D. W. (1989). *Pathology Annual*, **24** (pt. 2), 103.
39. Wilson G. D., McNally N. J., Dische S., Bennett M. H. (1988). *Br. J. Radiol.*, **61**, 419.

ВЫДЕЛЕНИЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ИЗ КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦОВ И КЛЕТОЧНЫХ КУЛЬТУР

Виктор Т.-В. Чан

1. Молекулярный анализ нуклеиновых кислот и изучение болезней человека

Молекулярный анализ нуклеиновых кислот позволяет обнаруживать специфические нарушения в генах, оценивать их влияние на экспрессию генов и, в конечном итоге, на физиологию клетки. Аномальную (измененную или экзогенную) нуклеотидную последовательность выявляют с помощью блот-гибридизации, затем выделяют ее методами молекулярного клонирования и получают в препаративных количествах. Далее такую последовательность можно использовать для изучения белок-кодирующих участков и регуляторных областей. Изменения в регуляторных областях могут приводить к изменению уровня экспрессии соответствующих генов, а в кодирующих последовательностях — к изменению биологических свойств кодируемых ими белков. Кроме того, клонированные последовательности могут использоваться как матрицы для синтеза белков в прокариотических и эукариотических системах экспрессии. Изучение функций этих белков позволяет определять их роль в работе клетки в норме и патологии. Влияние генетических нарушений на функционирование клетки можно изучать и путем их внесения в эндогенные копии соответствующих генов в нормальных клетках с помощью направленного переноса генов в системах *in vitro* или у трансгенных животных *in vivo*. В большинстве работ по изучению заболеваний человека используется именно такой подход. Так, вводя активированные онкогены в нормальные клетки, индуцируют опухолевый рост, а вводя в опухолевые клетки функционально активные гены—супрессоры опухолей, частично подавляют рост опухолей у животных. К числу приоритетных направлений относится также разработка методов генотерапии наследственных заболеваний с помощью направленного переноса генов. Успех любого исследования такого рода зависит прежде всего от того, удастся ли выявить ассоциированные с данным заболеванием нарушения в определенном гене.

1.1. Выделение нуклеиновых кислот

Чтобы проводить молекулярный анализ нуклеиновых кислот, нужно прежде всего получить их в чистом виде. Если источником нуклеиновых кислот служит клинический образец, то необходимо подобрать оптимальные методы выделения, позволяющие получить максимальное количество высокочистого продукта, поскольку размер таких образцов обычно очень мал и часто их бывает сложно получить повторно. При работе с культурами клеток можно использовать более простые методы выделения, так как выход нуклеиновых кислот увеличивается пропорционально объему культуры.

Типичная диплоидная клетка человека в норме содержит примерно 7 пг геномной ДНК и разное количество митохондриальной ДНК. Таким образом, суммарный продукт, выделяемый из клинических образцов, представляет собой смесь геномной и митохондриальной ДНК. Получить чистую геномную ДНК можно только одним способом: выделением ядер и освобождением из них ДНК. Впрочем, в большинстве случаев эксперименты можно проводить на суммарной ДНК, поскольку митохондриальная ДНК обычно не мешает анализу.

Типичная клетка млекопитающих содержит около 15 пг РНК. Из них 80–85% приходится на долю рибосомной (28S, 18S и 5S) РНК, а остальная часть представлена в основном низкомолекулярными РНК (транспортными и малыми ядерными). И лишь 1–5% суммарной РНК составляет информационная РНК (мРНК), гетерогенная как по размеру, так и по первичной структуре. К счастью, в большинстве случаев на 3'-конце мРНК эукариот находится poly(A)-«хвост». Он может образовывать комплекс с фрагментом oligo(dT), что позволяет проводить очистку мРНК с помощью аффинной хроматографии на oligo(dT)-целлюлозе.

В этой главе описано несколько методов выделения ДНК и РНК. Их сможет легко освоить любой даже не очень опытный экспериментатор. Представлены методы выделения нуклеиновых кислот только из клеточного материала и свежих/замороженных тканей; выделение ДНК из архивных биоптатов описано в гл. 21. Выбор конкретного метода зависит от целей эксперимента.

2. Выделение ДНК

Для выделения геномной ДНК разрушают плазматическую и ядерную мембраны и освобождаются от клеточных белков. Подго-

товка образца для выделения описана в протоколе 12.1. Для депотеинизации используют два метода:

- обработка белков протеазами (например, протеиназой К) в присутствии ЭДТА и детергентов (например, саркозила);
- денатурация и экстракция органическими растворителями (например, фенолом и хлороформом).

Эти методы описаны соответственно в протоколах 12.2 и 12.3.

Из водных растворов геномную ДНК можно осадить добавлением этанола или изопропанола. В обоих случаях в конечном итоге получаются фрагменты ДНК размером 100–200 т.н., пригодные для проведения блот-гибридизации по Саузерну и клонирования в бактериофаге λ . Однако для молекулярного клонирования в космидных векторах необходимы фрагменты большего размера (250–300 т.н.), так что при выделении ДНК нужно стремиться к минимальной фрагментации молекул. Конечный размер получающихся фрагментов ДНК зависит от двух основных факторов: действия клеточных нуклеаз и механического разрушения ДНК в процессе выделения. Эндогенные нуклеазы необходимо инактивировать сразу после лизиса клеток. Для этого лизат смешивают с ингибиторами нуклеаз. При этом следует иметь в виду, что если смешивание будет очень энергичным, может произойти гидродинамическая фрагментация молекул ДНК. Таким образом, образцы следует перемешивать тщательно, но осторожно. Механическое разрушение ДНК может происходить и во время экстракции органическими растворителями.

2.1. Выделение ДНК с использованием протеиназы К

Методы, описанные в протоколах 12.1 и 12.2, являются модификацией метода Блина и Стаффорда [1]. Клетки лизируют саркозилом, а белки расщепляют протеиназой К в присутствии ЭДТА.

Протокол 12.1. Подготовка образцов

Материалы

- Буфер для выделения: 300 мМ ацетат натрия, 50 мМ ЭДТА, pH 7,5. Непосредственно перед использованием добавляют РНКазу А до конечной концентрации 25 мкг/мл
- РНКазы А: готовят раствор РНКазы (20 мг/мл) в стерильной дистиллированной воде, кипятят 10 мин (для инактивации ДНКаз) и охлаждают 5 мин во льду. Хранят при -20°C

- Фосфатно-солевой буфер (ФСБ): 10 mM фосфатный буфер, 150 mM NaCl, pH 7,2
- Саркозил: готовят 10% (в/о) раствор саркозила в стерильной дистиллированной воде и прогревают его при 65 °C в течение как минимум 1 ч.

Методика

Конкретные детали методов зависят от характера образца.

А. Культивируемые клетки

1. Осаждают клетки ($1-5 \cdot 10^7$) в полипропиленовых пробирках на 50 мл центрифугированием при 800 g в течение 7 мин при 4 °C. Монослой сначала трипсинизируют, а суспензии центрифугируют сразу.
2. Промывают клетки в 20 мл холодного ФСБ.
3. Ресуспенсируют клетки в 10 мл буфера для выделения. Альтернативный вариант: ресуспенсируют клетки в 1 мл буфера для выделения, быстро замораживают в жидком азоте и хранят при температуре -70 °C или ниже. ДНК выделяют добавлением 9 мл подогретого буфера для выделения, содержащего протеиназу К (110 мкг/мл) и саркозил (0,55%, в/о).

Б. Образцы ткани

1. Образцы ткани, предназначенные для выделения из них нуклеиновых кислот, должны храниться при температуре не выше -70 °C.
2. Охлаждают в сухом льду стакан из нержавеющей стали для гомогенизатора Уоринга (Patterson Scientific).
3. Измельчают в порошок примерно 5 г сухого льда.
4. Добавляют замороженную ткань и измельчают.
5. Чтобы предотвратить размораживание ткани во время измельчения, постоянно добавляют сухой лед.
6. Переносят измельченную смесь в центрифужную полипропиленовую пробирку на 50 мл и дают испариться большей части сухого льда (но не всему льду).
7. Добавляют 10 мл буфера для выделения на 1 г ткани.

В. Кровь

1. Переносят 20 мл взятой с ЭДТА крови в центрифужную полипропиленовую пробирку на 50 мл с 30 мл 37,5 mM NaCl, pH 7,5. Тщательно перемешивают.
2. Осаждают лейкоциты центрифугированием при 800 g в течение 7 мин при 4 °C.

Протокол 12.1 (Продолжение)

3. Отбирают супернатант (лизированные эритроциты) и промывают осадок тем же раствором.
4. Ресуспендируют клетки в 10 мл буфера для выделения. Альтернативный вариант: ресуспендируют клетки в 1 мл буфера для выделения, быстро замораживают в жидком азоте и хранят при температуре не выше -70°C . ДНК можно выделить добавлением 9 мл подогретого буфера для выделения, содержащего протеиназу К (110 мкг/мл) и саркозил (0,55%, в/о).

Протокол 12.2. Выделение ДНК с использованием протеиназы К¹⁾

Материалы (см. также протокол 12.1)

- Протеиназа К
Растворяют лиофилизированную протеиназу К в стерильной дистиллированной воде в концентрации 20 мг/мл, разливают на аликвоты и хранят при -20°C .
- Насыщенный буфером фенол
В большинстве случаев фенол высокой степени чистоты можно использовать без дополнительной перегонки. Расплавляют фенол при 65°C в присутствии равного объема 0,5 М трис- HCl , pH 8,0, содержащего 0,2% 8-гидроксихинолин и 0,2% 2-меркаптоэтанол (2-МЭ). Когда фенол полностью расплавится, тщательно перемешивают смесь, отбирают водную фазу и дважды экстрагируют фенол 0,1 М трис- HCl , pH 8,0, содержащим 0,2% 2-МЭ. После последней экстракции водную фазу не удаляют, а оставляют ее в сосуде с фенолом. В таком виде насыщенный фенол может храниться при 4°C до 1 мес
- Смесь хлороформ:изоамиловый спирт (24:1, о/о)
- Буфер ТЭ: 10 мМ трис- HCl , 1 мМ ЭДТА, pH 8,0

Методика

1. Готовят образцы, как описано в протоколе 12.1.
2. Добавляют к каждому образцу по 50 мкл раствора протеиназы К (20 мг/мл) и тщательно перемешивают.
3. Добавляют к каждому образцу по 250 мкл раствора саркозила, тщательно и осторожно перемешивают.
4. Центрифугируют образцы при 3500 g в течение 30 с.
5. Инкубируют образцы при 50°C в течение 5 ч. Для удобства инкубацию можно проводить в течение ночи (до 16 ч).
6. Добавляют к каждому образцу по 10 мл насыщенного буфером фенола, тщательно перемешивают до образования гомогенной эмульсии.

7. Продолжают экстракцию перемешиванием при комнатной температуре в течение 5 мин.
8. Центрифугируют при 3500 g в течение 1 мин.
9. Добавляют 10 мл смеси хлороформ : изоамиловый спирт и продолжают экстракцию в течение 5 мин.
10. Разделяют водную и органическую фазы центрифугированием при 3500 g в течение 6 мин при комнатной температуре.
11. Переносят вязкую водную фазу в новую пробирку при помощи пипетки с широким отверстием и повторяют экстракцию смесью хлороформ:изоамиловый спирт один или два раза (пока интерфаза не станет чистой).
12. Добавляют к водной фазе два объема этанола, тщательно и осторожно перемешивают. Сразу после перемешивания образуется осадок ДНК.
13. Собирают осадок ДНК центрифугированием при 3500 g в течение 5 мин.
14. Отбирают супернатант и промывают ДНК 20 мл 70% спирта.
15. Промывают ДНК 1 мл 70% спирта и переносят ДНК в микроцентрифужную пробирку.
16. Осаждают ДНК центрифугированием при 3500 g в течение 1 мин и отбирают супернатант.
17. Высушивают ДНК под вакуумом в течение 2,5 мин.
18. Растворяют ДНК в ТЭ до концентрации около 1 мг/мл (разд. 6.2).

¹⁾ Хотя выделение ДНК этим методом занимает 1–2 дня, он не является трудоемким. Это связано с тем, что после обработки протеиназой К большинство клеточных белков расщепляется до олигопептидов, собирающихся при экстракции фенолом/хлороформом в небольшом объеме.

2.2. Выделение ДНК с помощью быстрого фенольного метода

В протоколе 12.3 описана модификация оригинального метода выделения ДНК, в котором используется замороженный фенол [2]. Клетки лизируют саркозилем и горячим фенолом, который, кроме того, экстрагирует клеточные белки.

Протокол 12.3. Выделение ДНК с помощью быстрого фенольного метода¹⁾

Материалы (см. также протоколы 12.1 и 12.2)

- Буфер для выделения (без РНКазы)
- 10% (в/о) саркозил

Протокол 12.3 (Продолжение)

- Насыщенный буфером фенол
- Смесь хлороформ:изоамиловый спирт (24:1, о/о)

Методика

1. Готовят образцы для выделения ДНК согласно протоколу 12.1, но ресуспендируют клетки (или образцы тканей) в 2,5 мл буфера для выделения (без РНКазы А).
2. Во время подготовки образцов нагревают до 65 °С смесь из 7,5 мл буфера для выделения, содержащего 0,5% саркозил, и 10 мл насыщенного буфером фенола.
3. Заливают подготовленной нагретой смесью фенола с буфером образцы для выделения ДНК, осторожно и тщательно перемешивают до образования гомогенной эмульсии.
4. Продолжают экстракцию перемешиванием при комнатной температуре в течение 5 мин.
5. Центрифугируют непродолжительное время при 3500 g.
6. Добавляют 10 мл смеси хлороформ:изоамиловый спирт и продолжают экстракцию при комнатной температуре в течение 5 мин.
7. Разделяют водную и органическую фазы центрифугированием при 3500 g в течение 6 мин при комнатной температуре.
8. Переносят водную фазу и интерфазу с белками в новую пробирку с помощью пипетки с широким отверстием.
9. Добавляют 10 мл смеси хлороформ:изоамиловый спирт и перемешивают при комнатной температуре в течение 5 мин.
10. Разделяют две фазы центрифугированием при 3500 g в течение 5 мин и переносят только водную фазу в новую пробирку.
11. Добавляют 10 мл смеси хлороформ:изоамиловый спирт, перемешивают при комнатной температуре в течение 5 мин, разделяют водную и органическую фазы в соответствии с п. 10 и переносят водную фазу в новую пробирку.
12. Повторяют п. 11, после чего переосаждают ДНК. Для этого добавляют к водной фазе два объема этанола.
13. Тщательно и осторожно перемешивают водную фазу с этанолом. Сразу после перемешивания образуется осадок ДНК.
14. Собирают ДНК центрифугированием при 3500 g в течение 5 мин.
15. Отбирают супернатант и промывают ДНК 20 мл 70% спирта.
16. Промывают ДНК 1 мл 70% спирта и переносят ее в микроцентрифужную пробирку.

17. Собирают ДНК центрифугированием при 3500 g в течение 1 мин и отбирают супернатант.
18. Высушивают ДНК под вакуумом в течение 2,5 мин.
19. Растворяют ДНК в ТЭ (содержащем 2,5 мкг/мл РНКазы А) до концентрации примерно 1 мг/мл (разд. 6.2).

¹⁾ Быстрый фенольный метод требует значительно меньше времени, чем метод с использованием протеиназы К. Однако он несколько более трудоемок, поскольку все клеточные белки должны быть экстрагированы с помощью фенола/хлороформа. В результате в препаратах ДНК могут присутствовать следовые количества белка, но они обычно не влияют на последующие манипуляции (например, на электрофоретическое разделение и рестрикцию).

2.3. Выделение высокомолекулярной ДНК

Описанный в протоколе 12.4 метод представляет собой модификацию метода, предложенного в работе [3]. Лизис клеток и расщепление клеточных белков осуществляют, как в методе с использованием протеиназы К (см. протокол 12.2). Однако экстракцию фенолом/хлороформом не проводят, что уменьшает вероятность механической деградации ДНК.

Протокол 12.4. Выделение высокомолекулярной ДНК

Материалы (см. также протоколы 12.1 и 12.2)

- Буфер для выделения
- РНКазы А: 20 мг/мл
- Протеиназа К: 20 мг/мл
- 10% (в/о) саркозил
- Буфер для денатурации: 80% формамид, 20 mM трис-HCl, pH 8,0

В большинстве случаев формамид высокой степени чистоты можно использовать без какой-либо предварительной обработки. Однако если формамид имеет слегка желтоватый цвет, его деионизуют в течение 30 мин в шейкере при помощи смеси катионообменной и анионообменной смол (например, Bio-Rad AG 501-XG). Ионообменную смолу после этого удаляют фильтрованием или центрифугированием при 400 g в течение 5 мин, а деионизованный формамид хранят в аликвотах при -70°C .

- Буфер для диализа: 0,1 M ацетат натрия, 10 mM трис-HCl, pH 8,0, 10 mM ЭДТА
- Буфер ТЭ

Протокол 12.4 (Продолжение)

Методика

1. Готовят образцы тканей для выделения ДНК согласно протоколу 12.1 и проводят обработку протеиназой К согласно пп. 1–5 протокола 12.2.
2. Добавляют к каждому образцу 10 мл охлажденного до 4 °С буфера для денатурации и очень осторожно перемешивают.
3. Инкубируют образцы 6 ч при 15 °С.
4. Переносят вязкий раствор в диализный мешок (Sartorius SM 13200E или аналогичный) и диализуют трижды против 5 л буфера для диализа.
5. Пять раз диализуют раствор против 5 л ТЭ.
6. Полученный раствор ДНК можно сконцентрировать, поместив диализный мешок в сухие смолы для гель-фильтрации (например, в сефадекс G-50).
7. Переносят вязкий раствор ДНК в центрифужные пробирки (пробирку)¹⁾.

¹⁾ Полученная этим методом ДНК имеет размер 200–300 т.н. и, таким образом, является хорошим исходным материалом для молекулярного клонирования в космидных векторах.

3. Выделение РНК

Методы выделения ДНК и РНК в принципе не различаются, варьируют лишь некоторые методологические приемы. Для выделения РНК проводят лизис клеток, депротеинизацию клеточного лизата и отделение РНК от ДНК. Однако РНК по сравнению с ДНК гораздо более лабильна и чувствительна к действию нуклеаз. Кроме того, РНКазы менее чувствительны к действию денатурирующих белки веществ, чем ДНКазы. Все это затрудняет получение полноразмерной РНК и заставляет проводить инактивацию РНКаз одновременно с лизисом. Обычно молекулы РНК имеют небольшой размер, так что можно не очень опасаться их механической дегградации и интенсивно смешивать клеточный лизат с ингибиторами или инактиваторами РНКаз. Необходимо также принять все меры предосторожности для предотвращения случайного попадания РНКаз из других источников. Значительные количества РНКаз находятся на нашей коже, поэтому выделение РНК следует проводить в одноразовых резиновых перчатках. Необходимо также иметь в виду следующее (особенно если экспериментатор не слишком опытен):

- вся используемая вода должна быть обработана 0,1% диэтил-пироскарбонатом (ДЭПК) при 37 °С в течение ночи и затем проавтоклавирована. После такой обработки вода становится полностью свободной от РНКаз и может использоваться для приготовления растворов или для мытья всех необходимых для выделения РНК приспособлений. **ВВ!** Есть данные, что ДЭПК является канцерогеном, поэтому при работе с ним следует соблюдать все необходимые меры предосторожности;
- лучше всего использовать для выделения РНК стерильную одноразовую пластиковую посуду, поскольку на ней нет РНКаз. Обычную лабораторную стеклянную или пластиковую посуду необходимо замочить в обработанной ДЭПК воде на 2 ч при 37 °С, затем тщательно промыть в обработанной ДЭПК воде и автоклавировать;
- растворы, используемые для выделения РНК, необходимо обработать 0,1% ДЭПК при 37 °С в течение ночи и проавтоклавировать. Их также можно приготовить на обработанной ДЭПК воде. При этом надо иметь в виду, что ДЭПК активно реагирует с содержащими аминокислоты веществами и поэтому не может применяться для обработки растворов, содержащих трис. Трис-содержащие буферы нужно готовить на обработанной ДЭПК воде из специально предназначенных для молекулярной биологии препаратов триса и после приготовления автоклавировать;
- крайне желательно иметь оборудование (стеклянную и пластиковую посуду, автоматические пипетки, камеры для электрофореза и т. д.), предназначенное исключительно для работы с РНК, и выделить в лаборатории место, где не проводится никаких работ с РНКазами;
- ингибиторы РНКаз должны использоваться везде, где это возможно: в буферах для выделения РНК, при последующих экспериментах, при хранении РНК в водных растворах. Белковые ингибиторы РНКаз производятся несколькими фирмами (например, Sigma) и могут применяться в том виде, в каком они поступают; хранить и применять их необходимо в соответствии с рекомендациями фирмы-изготовителя. Поскольку эти ингибиторы могут денатурировать под действием денатурирующих агентов или деградировать под действием протеаз, их использование при выделении РНК сравнительно малоэффективно;

- некоторые фирмы (например, Sigma) производят также ванадил-рибонуклеозидные комплексы. Эти комплексы, образованные ионом оксованадия и любым из четырех рибонуклеозидов, связываются со многими РНКазы и практически полностью их ингибируют. Комплексы добавляют к растворам для выделения и используют на всех необходимых этапах. Однако следует помнить, что они ингибируют трансляцию РНК в бесклеточной системе синтеза белка; в этих случаях их необходимо удалять из препаратов РНК многократной экстракцией фенолом.

3.1. Выделение РНК с использованием протеиназы К

Представленный в протоколе 12.5 метод является модификацией метода, описанного в работе [4], и может использоваться только в тех случаях, когда возможна дезинтеграция образцов тканей до отдельных клеток. Таким образом, он пригоден для выделения РНК из замороженных тканей, поскольку в этом случае додецилсульфат натрия (ДСН) и протеиназа К не могут проникнуть внутрь ткани. Кроме того, эндогенные РНКазы до протеолиза протеиназой К могут в значительной степени деградировать РНК.

Протокол 12.5. Выделение РНК с использованием протеиназы К

Материалы (см. также протоколы 12.1 и 12.2)

Все реактивы должны быть свободны от РНКаз или обработаны ДЭПК.

- Буфер для выделения: 0,15 М NaCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8,5, 0,5% нонидет Р-40, 1 мМ дитиотрейтол (ДТТ), 20 мМ ванадил-рибонуклеозидные комплексы
- Буфер для протеиназы К: 200 мМ трис-ацетат, 300 мМ ацетат натрия, 50 мМ ЭДТА, pH 7,5, 2% (в/о) ДСН
- Раствор ДСН: готовят 10% раствор ДСН (в/о) в стерильной дистиллированной воде и прогревают его при 65 °С в течение как минимум 1 ч
- Раствор протеиназы К: 20 мг/мл
- Насыщенный буфером фенол
- Смесь хлороформ:изоамиловый спирт (24:1, о/о)
- Буфер ТЭ

Методика

1. Готовят образцы для выделения РНК, как описано в протоколе 12.1.
2. После отмывания клеток в ФСБ ресуспендируют их в 1 мл ФСБ и переносят суспензию в микроцентрифужную пробирку.
3. Собирают клетки центрифугированием при 14 000 g в течение 7 с при 4 °С.
4. Ресуспендируют клетки интенсивным встряхиванием в 200 мкл охлажденного во льду буфера для выделения.
5. Для выделения цитоплазматической РНК центрифугируют клеточный лизат при 14 000 g в течение 2 мин при 4 °С и переносят супернатант в новую пробирку. Содержащий ядра осадок выбрасывают.
6. Добавляют к каждому образцу по 200 мкл буфера для протеиназы К, содержащего 400 мкг/мл протеиназы К.
7. Инкубируют образцы 30 мин при 37 °С¹⁾.
8. Добавляют к образцу равный объем смеси насыщенного буфером фенола с хлороформом : изоамиловым спиртом²⁾ и перемешивают в течение 5 мин при комнатной температуре.
9. Центрифугируют образец при 14 000 g в течение 2 мин при комнатной температуре.
10. Переносят водную фазу в новую пробирку и проводят экстракцию смесью хлороформ : изоамиловый спирт при комнатной температуре в течение 5 мин.
11. Повторяют п. 10 еще раз.
12. Переносят водную фазу в новую пробирку и добавляют к образцу 2,5 объема этанола.
13. Для образования осадка РНК помещают пробирку в сухой лед на 30 мин.
14. Собирают РНК центрифугированием при 14 000 g в течение 10 мин при 4 °С, затем промывают осадок РНК 700 мкл 80% этанола.
15. Высушивают осадок под вакуумом в течение 2,5 мин, растворяют его в 300 мкл ТЭ и добавляют 750 мкл этанола.
16. Хранят полученные образцы при -70 °С.
17. Для получения РНК переносят аликвоту спиртового раствора в микроцентрифужную пробирку и добавляют 3 М ацетат натрия до конечной концентрации 0,3 М.
18. Тщательно перемешивают и инкубируют раствор при -70 °С в течение 15 мин.

Протокол 12.5 (Продолжение)

19. Осадок РНК собирают центрифугированием при 14 000 g в течение 10 мин при 4 °С.
20. Промывают осадок 80% этанолом, высушивают его под вакуумом и растворяют РНК в ТЭ.

¹⁾ При выделении суммарной РНК п. 5 можно опустить. После добавления протеиназы К набирают лизат в шприц с иглой № 23 и выдавливают его обратно в пробирку. Повторяют эту операцию пять раз. После обработки протеиназой К добавляют 200 мкл 3 М ацетата натрия, рН 5,2, и 600 мкл насыщенного водой (вместо насыщенного буфером) фенола. Экстрагируют РНК перемешиванием в течение 5 мин при комнатной температуре, центрифугируют образец при 14 000 g в течение 2 мин, переносят водную фазу в свежую пробирку и переходят к следующему этапу.

²⁾ Пропорция образец : насыщенный буфером фенол : хлороформ : изоамиловый спирт — 50 : 25 : 24 : 1.

3.2. Выделение РНК с помощью гуанидинтиоцианата

Представленный в протоколе 12.6 метод является модификацией метода, описанного в статьях [5, 6]. Он дает хорошие результаты при работе с образцами, содержащими большие количества РНКаз, и, по-видимому, является наиболее распространенным методом выделения РНК. Гуанидинтиоцианат — очень сильный денатурирующий агент, который используется для одновременного лизиса клеток и денатурации всех клеточных белков (в том числе РНКаз). Поскольку плавающая плотность РНК (примерно 1,9 г/мл) намного выше, чем у ДНК и белков, ее можно отделить от других клеточных компонентов равновесным центрифугированием в градиенте плотности CsCl.

Протокол 12.6. Выделение РНК с помощью гуанидинтиоцианата

Материалы

Все реактивы должны быть свободны от РНКаз или обработаны ДЭПК.

- Буфер для гомогенизации: 4 М гуанидинтиоцианат, 100 мМ трис-НСl, рН 7,5. Перед использованием в буфер добавляют 2-меркаптоэтанол до 1% (о/о)
- Хлористый цезий: 5,7 М раствор в 10 × ТЭ
- 10 × ТЭ: 100 мМ трис-НСl, 10 мМ ЭДТА, рН 8,0

Методика

1. Готовят образцы для выделения РНК, как это описано в протоколе 12.1.

2. Добавляют к каждому образцу по 3 мл буфера для гомогенизации и интенсивно перемешивают.
3. Набирают гомогенат в стерильный шприц для подкожных инъекций с иглой № 23 и выдавливают его обратно в пробирку.
4. Повторяют п. 3 пять раз.
5. Осаждают все негомогенизированные фрагменты ткани центрифугированием при 3500 g в течение 10 мин при комнатной температуре (эту процедуру можно не проводить, если РНК выделяют из клеточной суспензии).
6. Центрифугирование в градиенте плотности можно проводить двумя способами. Если используется ротор Beckman SW41 (или его аналог), то в чистую центрифужную пробирку наливают 8 мл 5,7 М CsCl и сверху наслаивают гомогенат. Другой подход (например, если используется ротор SW55) состоит в добавлении 0,8 г CsCl на каждый миллилитр гомогената и наслаивании полученного раствора в чистой центрифужной пробирке на 1,5 мл 5,7 М CsCl. При центрифугировании ДНК будет собираться в верхней части подслаивающего раствора («подушки»), а РНК образует осадок на дне пробирки¹⁾. РНК при этом будет получена в интактном виде, а фрагменты ДНК будут иметь слишком маленький размер (примерно 30 т.н.), чтобы их можно было использовать в большинстве экспериментов.
7. Центрифугируют при 200 000 g в течение 16 ч при 20 °C (45 000 об/мин, если используется ротор SW55) или при 135 000 g в течение 24 ч при 20 °C (32 000 об/мин, если используется ротор SW41).
8. Отсасывают раствор до уровня «подушки». После этого при необходимости можно отобрать клеточную ДНК, образующую в верхней части подушки видимую белую полосу.
9. Осторожно, чтобы не взмутить осадок РНК, микропипеткой полностью отбирают весь оставшийся раствор.
10. Добавляют в пробирку 750 мкл этанола и переносят его вместе с осадком РНК в микроцентрифужную пробирку.
11. Центрифужную пробирку промывают 750 мкл 80% этанола и переносят его в ту же микроцентрифужную пробирку. Получаемый на этой стадии осадок РНК можно хранить под спиртом при -70 °C.
12. Центрифугируют РНК при 14 000 g в течение 5 мин при комнатной температуре.
13. Отбирают супернатант, промывают осадок 80% этанолом и центрифугируют при 14 000 g в течение 5 мин при комнатной температуре.

Протокол 12.6 (Продолжение)

14. Отбирают супернатант и подсушивают осадок в течение 2,5 мин под вакуумом.
15. Растворяют осадок РНК в 300 мкл ТЭ, добавляют 750 мкл этанола и хранят образцы при -70°C .
16. Водный раствор РНК получают, как это описано в пп. 17–20 протокола 12.5.

¹⁾ Альтернативный вариант. В центрифужную пробирку вносят 0,75 мл трифторацетата цезия (CsTFA) с плотностью 2 г/мл и наслаивают на него «подушку» из CsTFA с плотностью 1,7 г/мл. Плотность гомогената добавлением CsTFA доводят до 1,4 г/мл и наслаивают его на «подушку» из CsTFA . После центрифугирования РНК и ДНК собираются соответственно в верхней части первой (у дна) и второй «подушек». Введение в растворы CsTFA бромистого этидия до конечной концентрации 25 мкг/мл облегчает визуализацию нуклеиновых кислот, так что ДНК и РНК можно собрать шприцом с иглой, проколов стенку центрифужной пробирки на нужной высоте. Бромистый этидий удаляют из препаратов нуклеиновых кислот до их пересаживания экстракцией изобутанолом (см. протокол 2.3).

4. Одновременное выделение ДНК и РНК

Выделение высокомолекулярной ДНК и РНК — предварительный этап в большинстве молекулярно-биологических работ. Эффективность этой процедуры не очень важна, когда работают, например, с клеточными культурами: в этом случае количество получаемых нуклеиновых кислот можно увеличить простым увеличением биомассы. Однако проблема эффективности становится весьма существенной, когда исследуются клинические образцы, поскольку при биопсии часто удается получить лишь очень небольшое количество материала, а проводить ее повторно бывает затруднительно. Один из путей решения проблемы малого количества материала — одновременное выделение из ткани как можно большего количества высококачественных ДНК и РНК. Однако для получения высокомолекулярной ДНК необходима щадящая гомогенизация ткани, что препятствует проникновению в клетки ингибиторов нуклеаз и способствует деградации нуклеиновых кислот, особенно РНК. В то же время энергичная гомогенизация клеток приводит к сильному механическому разрушению ДНК. Чтобы минимизировать деградацию РНК при сохранении высокомолекулярной ДНК, замороженный препарат гомогенизируют в присутствии замороженного фенола и потом одновременно расплавляют препарат и фенол. Это обеспечивает тесный контакт между нуклеазами и их инактиваторами и создает оптимальные

условия для выделения высокомолекулярной ДНК и интактной РНК с высоким выходом из очень небольших количеств ткани [2]. Детальное описание этого метода приведено в протоколе 12.7.

Протокол 12.7. Одновременное выделение высокомолекулярной ДНК и РНК с использованием замороженного фенола

Материалы (см. также протоколы 12.1 и 12.2)

Все реактивы должны быть свободны от РНКаз или обработаны ДЭПК.

- Буфер для выделения: 300 мМ ацетат натрия, 50 мМ ЭДТА, pH 7,5. Перед использованием добавляют саркозил до концентрации 0,5% (в/о)
- Саркозил: готовят 10% раствор (в/о) в стерильной дистиллированной воде, прогревают его при 65 °С в течение минимум 1 ч
- Насыщенный буфером фенол
- Смесь хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1, о/о)
- 10 × ТЭ: 100 мМ трис-НCl, 10 мМ ЭДТА, pH 8,0
- Раствор хлористого цезия: 1,3 г CsCl на 1 мл 10 × ТЭ (конечная плотность — 1,7 г/мл)
- Бромистый этидий: 10 мг/мл в стерильной дистиллированной воде
- 3 М ацетат натрия, pH 5,2

Методика

1. Смешивают в полипропиленовой пробирке на 50 мл 5 мл насыщенного буфером фенола и 5 мл буфера для выделения.
2. Интенсивно гомогенизируют и быстро помещают полученную эмульсию в жидкий азот. Выдерживают ее в азоте до начала замерзания.
3. Охлаждают в сухом льду стакан из нержавеющей стали для гомогенизатора Уоринга (Patterson Scientific).
4. Измельчают в порошок примерно 5 г сухого льда и добавляют немного замороженной смеси фенола с буфером для выделения.
5. Измельчают в порошок смесь фенола с буфером для выделения и добавляют в стакан гомогенизатора еще немного этой смеси.
6. Повторяют измельчение до тех пор, пока вся смесь фенола с буфером для выделения не будет измельчена.
7. Добавляют замороженную ткань к порошку фенол/буфер для выделения и измельчают до порошкообразного состояния. Во время измельчения смесь должна быть полностью заморожена, для чего при необходимости в стакан добавляют сухой лед.

Протокол 12.7 (Продолжение)

8. Переносят порошкообразную смесь в полипропиленовую пробирку на 50 мл и быстро при осторожном перемешивании плавают смесь фенол/буфер/ткань в водяной бане при 65 °С. При этом крышку пробирки плотно не закрывают.
9. Когда фенол начнет плавиться, осторожно и тщательно перемешивают содержимое пробирки до образования однородной эмульсии¹⁾.
10. После полного расплавления фенола смесь перемешивают при комнатной температуре в течение 5 мин.
11. Центрифугируют образец при 3500 g в течение 1 мин и добавляют 5 мл смеси хлороформа с изоамиловым спиртом.
12. Перемешивают образец со смесью фенол/хлороформ : изоамиловый спирт в течение 5 мин при комнатной температуре.
13. Разделяют водную и органическую фазы центрифугированием при 3500 g в течение 5 мин при комнатной температуре.
14. Переносят водную фазу и белковую интерфазу в новую пробирку, добавляют равный объем смеси хлороформ : изоамиловый спирт и перемешивают в течение 5 мин при комнатной температуре.
15. Разделяют фазы центрифугированием при 3500 g в течение 5 мин при комнатной температуре и переносят только водную фазу в новую пробирку.
16. Повторяют п. 15 еще раз.
17. Добавляют на каждый миллилитр полученного тканевого экстракта 0,8 г CsCl.
18. В центрифужную пробирку вносят 3 мл раствора CsCl и аккуратно наслаивают на эту подушку полученный в п. 17 раствор. К тканевому экстракту можно добавить бромистый этидий (до концентрации 25 мкг/мл), чтобы облегчить последующую визуализацию нуклеиновых кислот.
19. Центрифугируют при 135 000 g в течение 24 ч при 25 °С (например, при 32 000 об/мин в роторе SW41).
20. После центрифугирования ДНК образует полосу в верхней части подушки из CsCl, а РНК осаждается на дне пробирки.
21. ДНК отбирают пипеткой с широким наконечником и переносят ее в новую пробирку. Остальной раствор осторожно, чтобы не взмутить осадок РНК, отбирают микропипеткой.
22. Добавляют в пробирку 750 мкл 80% этанола и переносят его вместе с осадком РНК в микроцентрифужную пробирку.

23. Промывают центрифужную пробирку 750 мкл 80% этанола и переносят его в микроцентрифужную пробирку с осадком РНК²⁾.
24. К раствору ДНК добавляют равный объем стерильной дистиллированной воды и затем два начальных (или один конечный) объема изопропанола. Осторожно перемешивают для образования осадка ДНК.
25. Осадок ДНК собирают центрифугированием при 3500 g в течение 5 мин при комнатной температуре.
26. Отбирают супернатант и промывают осадок ДНК 2–3 раза 70% этанолом.
27. Высушивают осадок ДНК под вакуумом в течение 2,5 мин и растворяют в ТЭ до концентрации примерно 1 мг/мл (см. разд. 6.2).
28. Осадок РНК собирают центрифугированием при 14 000 g в течение 5 мин при комнатной температуре и отбирают супернатант. Промывают осадок 80% этанолом.
29. Растворяют осадок РНК в 300 мкл ТЭ, добавляют 750 мкл абсолютного этанола и хранят образцы под спиртом при -70°C .
30. РНК для дальнейшей работы получают согласно пп. 17–20 протокола 12.5.

¹⁾ Этим методом удастся получить препараты ДНК и РНК достаточно высокого качества, пригодные для Саузерн- и Нозерн-гибридизации. Эффективность экстракции РНК и ДНК определяется скоростью инактивации нуклеаз, поэтому во время плавления фенола образцы должны быть перемешаны с фенолом очень тщательно до образования гомогенной эмульсии.

²⁾ На этом этапе ДНК и РНК можно хранить при температуре соответственно 4°C и -70°C . Бромистый этидий можно удалить экстракцией изобутанолом (см. протокол 2.3).

5. Очистка poly(A)⁺-РНК

В буферах с высокой ионной силой poly(A)⁺-хвост полиаденилированной РНК образует комплекс с oligo(dT), ковалентно связанной с твердой матрицей (например, с целлюлозой). Это позволяет выделять мРНК из сложной популяции клеточных РНК. Если нанести на колонку с oligo(dT)-целлюлозой суммарную клеточную РНК в буфере с высокой ионной силой, то на колонке задержится только poly(A)⁺-РНК, которую можно затем элюировать буфером с низкой ионной силой или водой и сконцентрировать переосаждением этанолом. Этот метод описан в протоколе 12.8.

Протокол 12.8. Выделение poly(A)⁺-РНК

Материалы

Все реактивы должны быть свободны от РНКаз или обработаны ДЭПК.

- 2 × буфер для нанесения: 50 мМ трис-НСl, рН 7,5, 1 М NaCl, 5 мМ ЭДТА, 0,2% (в/о) ДСН
- Oligo(dT)-целлюлоза
- 5 М NaCl

Методика

1. Ресуспендируют 1 г oligo(dT)-целлюлозы в стерильной дистиллированной обработанной ДЭПК воде и набивают этой целлюлозой одноразовую колонку или шприц (объем упакованной колонки должен быть около 1 мл).
2. Промывают колонку горячей (65 °С) водой и 5 мл 1 × буфера для нанесения.
3. Растворяют образец РНК в 250 мкл воды, прогревают его 5 мин при 65 °С, быстро охлаждают до комнатной температуры и добавляют равный объем 2 × буфера для нанесения.
4. Наносят образец на колонку и сразу собирают элюат.
5. Промывают колонку 1 мл буфера для нанесения и объединяют элюаты.
6. Прогревают суммарный элюат 5 мин при 65 °С, быстро охлаждают до 20 °С и повторно наносят его на колонку.
7. Промывают колонку буфером для нанесения (10 раз по 1 мл) для полной элюции poly(A)⁺-РНК.
8. Для элюции poly(A)⁺-РНК наносят на колонку 1,8 мл горячей (65 °С) воды и сразу собирают элюат.
9. Прогревают элюат 5 мин при 65 °С и быстро охлаждают его до комнатной температуры.
10. Добавляют 0,2 мл 5 М NaCl, наносят смесь на новую колонку и повторяют пп. 4–7.
11. Элюируют poly(A)⁺-РНК двумя порциями по 1 мл горячей (65 °С) воды.
12. Экстракцией изобутанолом концентрируют элюат до объема примерно 400 мкл.
13. Добавляют к образцу 2,5 объема этанола и хранят при –70 °С.
14. poly(A)⁺-РНК можно получить, как это описано в пп. 17–20 протокола 12.5.

6. Анализ РНК и ДНК

После выделения ДНК и/или РНК и до проведения дальнейших исследований необходимо определить чистоту препаратов и размер молекул. Загрязняющие примеси в препаратах нуклеиновых кислот могут ингибировать последующие ферментативные реакции с их участием (например, рестрикцию ДНК). При наличии загрязнений повторно проводят обработку протеиназой К и экстракцию фенолом/хлороформом; обычно этого бывает достаточно. Если препараты РНК предполагается использовать только для Нозерн-блот-гибридизации (см. гл. 14), то дополнительная ферментативная обработка не требуется. ДНК должна быть достаточно высокомолекулярной, чтобы можно было проводить планируемые эксперименты, а РНК — интактной.

6.1. Качественный анализ

ДНК и РНК (одно- и двухцепочечные) движутся в геле со скоростью, обратно пропорциональной десятичному логарифму их молекулярной массы. При этом одноцепочечные молекулы движутся быстрее, чем двухцепочечные той же длины. Поскольку молекулярная масса нуклеиновых кислот пропорциональна их длине (в парах нуклеотидов или в тысячах пар нуклеотидов), можно построить стандартную кривую зависимости расстояния, на которое перемещается маркерный фрагмент, от десятичного логарифма длины этого фрагмента, и с ее помощью определять размеры фрагментов нуклеиновых кислот в данном препарате по расстоянию, на которое они перемещаются.

6.1.1. Гель-электрофорез ДНК

Фрагменты ДНК обычно разделяют с использованием агарозных гелей и трис-боратного буфера. Соответствующая методика описана в протоколе 12.9.

Протокол 12.9. Электрофорез в агарозном геле

Материалы

- 10 × буфер трис-борат-ЭДТА (ТБЭ): 0,9 М основной трис, 0,9 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА. рН доводят до 8,1–8,2 сухой борной кислотой
- Агароза (для электрофореза)
- Бромистый этидий: 10 мг/мл в стерильной дистиллированной воде

Протокол 12.9 (Продолжение)

- 6 × буфер для нанесения: 0,25% бромфеноловый синий, 40% (в/о) сахараза в 1 × ТБЭ

Методика

1. Готовят 1 × ТБЭ в объеме, достаточном для заполнения камеры для электрофореза и приготовления геля.
2. Добавляют к 1 × ТБЭ агарозу в количестве, необходимом для получения 0,35–0,45% (в/о) раствора, и нагревают в микроволновой печи до полного расплавления агарозы.
3. Охлаждают смесь до примерно 50 °С. За время охлаждения заклеивают края УФ-проницаемой кюветы для геля автоклавированной липкой лентой.
4. Добавляют к раствору агарозы бромистый этидий до конечной концентрации 0,5 мкг/мл и осторожно перемешивают, избегая появления в геле пузырьков воздуха.
5. Теплую агарозу выливают в кювету для геля и равномерно распределяют ее по кювете. Вертикально вставляют гребенку так, чтобы ее зубцы не доставали до дна примерно 1,5 мм.
6. Оставляют кювету с агарозным гелем на 30 мин, затем осторожно удаляют гребенку и липкую ленту. Кювету с гелем помещают в электрофорезную камеру, содержащую необходимое количество 1 × ТБЭ с бромистым этидием в конечной концентрации 0,5 мкг/мл.
7. Подготавливают к электрофорезу образцы исследуемой и маркерной ДНК, для чего смешивают их с буфером для нанесения (5:1, о/о). Чтобы получить четкий сигнал при окрашивании бромистым этидием, в лунку шириной 5 мм достаточно внести 200 нг маркерной ДНК. Для построения стандартной кривой необходимо использовать маркерные фрагменты, длина которых примерно равна длине исследуемой ДНК.
8. Осторожно вносят в лунки исследуемую и маркерную ДНК. Для повышения точности определения размера маркерную ДНК наносят по обе стороны от исследуемой¹⁾.
9. Проводят электрофорез при градиенте напряженности 1–3 В на 1 см геля в течение 1–3 ч²⁾.
10. Просматривают гель в УФ-свете на трансиллюминаторе и фотографируют его фотоаппаратом «Поляроид».

¹⁾ Для проведения гибридизации по Саузерну и клонирования в бактериофаге λ размер молекул ДНК должен составлять примерно 200 т.н., а при клонировании в космидах — примерно 300 т.н.

²⁾ До тех пор, пока бромфеноловый синий не дойдет до конца геля.

6.1.2. Гель-электрофорез РНК

Для предварительной оценки степени деградации РНК можно провести ее электрофорез в агарозном геле в ТБЭ (см. протокол 12.9). В препаратах РНК хорошего качества содержание 28S-РНК должно быть примерно в три раза выше, чем 18S-РНК. Если это отношение меньше, значит, РНК частично деградирована. Для более точной оценки качества образцов нужно провести гель-электрофорез денатурированной РНК или электрофорез в денатурирующих гелях [8, 9]. Эти два метода описаны соответственно в протоколах 12.10 и 12.11.

Протокол 12.10. Электрофорез РНК, денатурированной глиоксалем и ДМСО

Материалы

Все реактивы должны быть свободны от РНКаз или обработаны ДЭПК.

- 6 М глиоксаль: глиоксаль обычно поставляют в виде 40% (6 М) раствора. Поскольку глиоксаль быстро окисляется на воздухе, перед использованием его деионизируют с помощью катионообменной и анионообменной смол (например, Bio-Rad AG 501-X8), перемешивая глиоксаль вместе со смолами на орбитальном шейкере до достижения pH менее 5,0. Деионизованный глиоксаль хранят разлитым на аликвоты в плотно закрытых пробирках при -20°C . Пробирки должны быть заполнены максимально полно и каждую аликвоту можно использовать только один раз
- ДМСО: обычно высококачественный ДМСО можно использовать в том виде, в каком он поступает от фирмы, без какой-либо дополнительной обработки. Тем не менее бутылку со свежим ДМСО лучше разлить на аликвоты и хранить при -20°C . Каждую аликвоту необходимо использовать только один раз
- 10 × буфер для электрофореза: 100 мМ натрий-фосфатный буфер, pH 7,0
- Смесь для денатурации: 3 мл 6 М глиоксаля, 7,5 мл ДМСО и 1,5 мл 10 × буфера для электрофореза. Эту смесь хранят разлитой на аликвоты в плотно закрытых пробирках при -20°C . Пробирки должны быть заполнены практически полностью и использоваться только один раз
- Буфер для нанесения: 50% глицерин, 0,25% бромфеноловый синий в 1 × буфере для электрофореза
- Агароза (для электрофореза)

Протокол 12.10 (Продолжение)

Методика

1. Растворяют каждый образец РНК (содержащий примерно 20 мкг РНК) в 3 мкл обработанной ДЭПК воды и добавляют 12 мкл смеси для денатурации.
2. Денатурируют РНК прогреванием при 50 °С в течение 1 ч.¹⁾
3. Готовят 1,1% (в/о) агарозный гель в 1 × буфере для электрофореза (протокол 12.9) и охлаждают его до 70 °С. Для инактивации РНКаз добавляют в гель сухой иодацетат натрия до конечной концентрации 10 мМ.
4. Охлаждают смесь до примерно 50 °С, выливают в кювету и оставляют на 30 мин при комнатной температуре.
5. Добавляют к каждому образцу РНК 2,5 мкл буфера для нанесения, осторожно перемешивают и быстро центрифугируют на микроцентрифуге при 12 000 g.
6. Вносят образцы в лунки агарозного геля и проводят электрофорез при градиенте напряженности 1–2 В/см в 1 × буфере для электрофореза. Во время электрофореза должна быть обеспечена рециркуляция буфера, чтобы его pH поддерживался на уровне 7,0, поскольку при pH 8,0 комплекс глиоксаль/РНК диссоциирует¹⁾.
7. Когда бромфеноловый синий дойдет до конца геля, электрофорез останавливают и окрашивают гель бромистым этидием (0,5 мкг/мл в 25 мМ трис-НСl, pH 9,0) в течение 1 ч при осторожном покачивании²⁾. При сильном фоновом окрашивании лишний бромистый этидий можно отмыть водой (две смены по 30 мин каждая).
8. Просматривают гель в УФ-трансиллюминаторе и фотографируют его фотоаппаратом «Поляроид»³⁾.

¹⁾ Важно полностью денатурировать РНК до электрофореза и поддерживать ее в таком состоянии во время его проведения, поскольку электрофоретическая подвижность РНК изменяется при образовании вторичной структуры. Чтобы электрофорез прошел успешно, необходимы качественные реактивы, использующиеся при приготовлении смеси для денатурации, и постоянная циркуляция буфера во время проведения электрофореза.

²⁾ Глиоксаль реагирует с бромистым этидием, поэтому при приготовлении геля и проведении электрофореза данный краситель не используют.

³⁾ Для препаратов интактной РНК интенсивность флуоресценции полосы, отвечающей 28S-РНК, должна быть как минимум в два раза выше, чем у полосы 18S-РНК.

Протокол 12.11. Электрофорез РНК в геле, содержащем формальдегид

Материалы

Все реактивы должны быть свободны от РНКаз или обработаны ДЭПК.

- Формальдегид: обычно его поставляют в виде 37% водного раствора. Формальдегид окисляется на воздухе, поэтому его необходимо хранить плотно закрытым. рН концентрированного раствора должен быть выше 4,0. Если рН становится ниже этого значения, формальдегид необходимо заменить
- Формамид: обычно формамид высокой степени чистоты можно использовать в том виде, в каком он поступает от фирмы. Однако если он имеет желтоватый цвет, его необходимо деионизовать с помощью смеси ионообменных смол, как это описано в протоколе 12.4
- 10 × буфер для электрофореза: 0,2 М MOPS, 75 мМ ацетат натрия, 20 мМ ЭДТА, рН 7,0
- Буфер для нанесения: 50% глицерин, 0,25% бромфеноловый синий в 1 × буфере для электрофореза

Методика

1. Готовят 1,6% (в/о) агарозу на обработанной ДЭПК воде и охлаждают раствор до примерно 60 °С (см. протокол 12.9).
2. Добавляют 1/7 объема 10 × буфера для электрофореза и 1/4 объема формальдегида (37% раствор), тщательно перемешивают. Конечная концентрация агарозы при этом равна примерно 1,1%.
3. Растворяют каждый образец РНК (содержащий примерно 20 мкг РНК) в 3,3 мкл воды и добавляют 1,5 мкл 10 × буфера для электрофореза, 7,5 мкл формамида и 2,7 мкл формальдегида.
4. Денатурируют РНК в течение 15 мин при 65 °С и охлаждают ее во льду в течение 5 мин.
5. Добавляют к каждому образцу по 2,5 мкл буфера для нанесения¹⁾, перемешивают и быстро центрифугируют на микроцентрифуге при 12 000 g.
6. Вносят образцы в лунки агарозного геля²⁾ и проводят электрофорез при градиенте напряженности 1–3 В/см в 1 × буфере для электрофореза. Через 1–2 ч после начала электрофореза буфер заменяют

Протокол 12.11 (Продолжение)

7. По окончании электрофореза (когда бромфеноловый синий дойдет до конца геля) окрашивают гель в водном растворе бромистого этидия (0,5 мкг/мл) при аккуратном покачивании в течение 1 ч. При сильном фоновом окрашивании лишний бромистый этидий отмывают водой (две смены по 30 мин каждая).
8. Просматривают гель на УФ-трансляминаторе и фотографируют его фотоаппаратом «Поляроид».

¹⁾ Бромистый этидий (1 мкл раствора с концентрацией 1 мг/мл) можно добавлять непосредственно в образцы РНК еще до электрофореза.

²⁾ Во время электрофореза в геле, содержащем формальдегид, фрагменты ДНК обычно деградируют. Кроме того, при проведении электрофореза в таких условиях молекулы РНК движутся быстрее, чем молекулы ДНК такого же размера. По этим причинам в качестве маркера необходимо использовать РНК, а не ДНК.

6.2. Количественный анализ нуклеиновых кислот

Для определения концентрации ДНК и РНК в растворе широко используются два метода. Наиболее простым и точным является спектрофотометрический метод, однако он обладает сравнительно малой чувствительностью. Если общее содержание нуклеиновых кислот невелико, то концентрацию ДНК и РНК можно определить по интенсивности их флуоресценции в УФ-свете после окрашивания бромистым этидием.

6.2.1. Спектрофотометрический метод

Концентрацию нуклеиновых кислот в растворе можно рассчитывать, измерив его оптическую плотность (ОД) при 260 нм. Одна единица ОД примерно соответствует концентрации двухцепочечной ДНК 50 мкг/мл и концентрации одноцепочечной ДНК и РНК 40 мкг/мл. Для оценки чистоты образцов можно использовать отношение между ОД при 260 и 280 нм. Для чистых препаратов ДНК и РНК оно должно быть равно соответственно 1,8 и 2. Если это отношение меньше, значит, препараты загрязнены белками или фенолом, и оценка концентрации будет неверна. В этом случае необходимо повторить обработку протеиназой К и экстракцию фенолом/хлороформом (см. протоколы 12.2 и 12.3).

6.2.2. Окрашивание бромистым этидием

а. Электрофоретический метод

Для примерной оценки концентрации препаратов ДНК или РНК (см. разд. 6.1) на гель наносят разные количества маркерных нуклеиновых кислот. Концентрацию исследуемых ДНК или РНК в образце оценивают, сравнивая интенсивность флуоресценции образца и стандартных маркеров с известной концентрацией. При этом важно, чтобы образцы ДНК и РНК сравнивались с соответствующими маркерами, поскольку при одинаковом количестве ДНК и РНК интенсивность их флуоресценции в УФ-свете различается.

б. Метод пятен

Концентрацию нуклеиновых кислот в растворе можно определить, окрасив раствор бромистым этидием, измерив интенсивность флуоресценции в УФ-свете и сравнив ее с флуоресценцией маркеров известной концентрации. Как и при электрофоретическом методе, маркеры должны представлять собой нуклеиновые кислоты соответствующего типа (т. е. ДНК или РНК). Этот метод описан в протоколе 12.12.

Протокол 12.12. Определение концентрации ДНК/РНК в растворе по данным флуоресценции в УФ-свете

Материалы

- ТЭ-буфер: 10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, рН 8,0
- Раствор бромистого этидия: 1 мкг/мл в ТЭ

Методика

1. Готовят серию разведений образца ДНК или РНК и соответствующих стандартных растворов в буфере ТЭ и добавляют ко всем разведениям равный объем раствора бромистого этидия.
 2. На трансиллюминатор кладут кусочек пластиковой пленки (типа Saran).
 3. На пленку наносят по 5 мкл каждого разведения образца и стандартного раствора.
 4. Определяют концентрацию образца, сравнивая интенсивности флуоресценции стандартного раствора и разведений. Для облегчения оценки можно сфотографировать пленку.
-

7. Хранение нуклеиновых кислот

- РНК необходимо хранить при -70°C в 70% этаноле.
- Для непродолжительного хранения ДНК достаточно температуры 4°C , для длительного более предпочтительна температура -70°C . В то же время повреждение ДНК свободными радикалами может быть сильнее при -70°C .
- ДНК нельзя хранить при -20°C , поскольку при этой температуре в ней образуется большое число одно- и двухцепочечных разрывов. Разрывы возникают также при замораживании—оттаивании препаратов.

Литература

1. *Blin N., Stafford D. W.* (1976). *Nucleic Acids Rec.*, **3**, 2303.
2. *Chan V. T. W., Fleming K. A., McGee J. O'D.* (1988) *Anal. Biochem.*, **168**, 16.
3. *Kupiec J. J., Giron M. L., Vilette D., Jeltsch J. M., Emanoil-Ravier R.* (1987). *Anal. Biochem.*, **164**, 53.
4. *Favorolo J., Freisman R., Kamen R.* (1980). In: *Methods in Enzymology* (ed. L. Grossman, K. Moldave), p. 718. Academic Press, New York.
5. *Glisin V., Crkvenjakov R., Byus C.* (1984). *Biochemistry*, **13**, 2633.
6. *Chirgwin J. M., Przybyla A. E., McDonald R. J., Rutter W. J.* (1979). *Biochemistry*, **18**, 5294.
7. *Aviv H., Leder P.* (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 1408.
8. *McMaster G. K., Carmichael G. G.* (1977). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 4835.
9. *Lehrach H., Diamond D., Wozney J. M., Boedtker H.* (1977). *Biochemistry*, **16**, 4743.

ПОЛУЧЕНИЕ ЗОНДОВ И ИХ МЕЧЕНИЕ

Юлия Е. Стикланд

1. Введение

В этой главе описаны методы очистки рекомбинатных бактериальных плазмид и последующее мечение клонированных вставок—фрагментов ДНК (или их РНК-копий) с использованием различных ферментативных методов. Рассмотрены методы как изотопного, так и неизотопного мечения, проведен их сравнительный анализ.

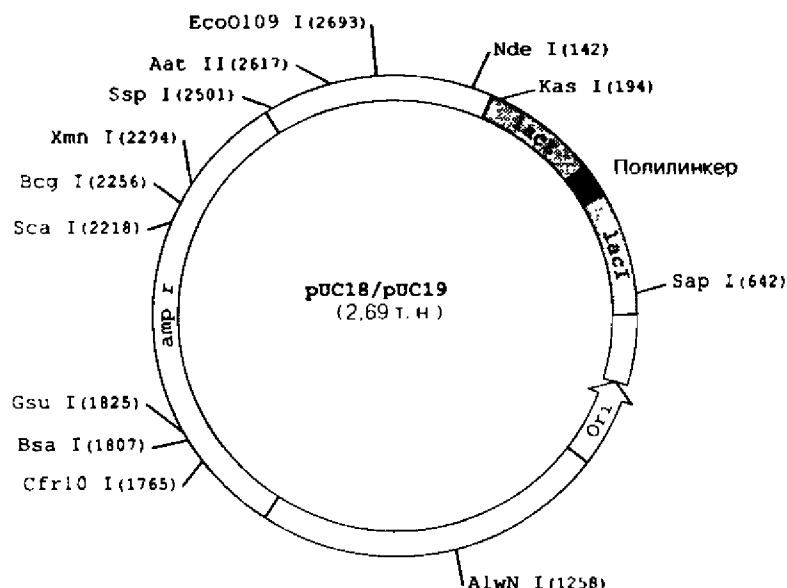
2. Бактериальные плазмиды

2.1. Основные положения

Бактериальные плазмиды — это двухцепочечные кольцевые замкнутые молекулы ДНК, размер которых варьирует от 1 до 200 т.н. Их репликация и распределение между дочерними клетками не зависит от бактериальной хромосомы, хотя для репликации и транскрипции они используют кодируемые клеткой-хозяином белки и ферменты.

В природных условиях многие плазмиды передаются в новую клетку-хозяина при конъюгации. В лаборатории плазмидную ДНК можно ввести в бактериальную клетку с помощью искусственного процесса трансформации [1]. Для этого клетку обрабатывают смесью двухвалентных катионов, и она временно становится проницаемой для малых молекул ДНК. Для отбора трансформантов используются кодируемые плазмидами селективные маркеры. Чаще всего это гены, которые обеспечивают устойчивость бактерий к антибиотикам, таким как тетрациклин и ампициллин.

За время развития геной инженерии размер плазмидных векторов для клонирования был уменьшен до минимума, с тем чтобы увеличить размер клонируемых фрагментов чужеродной ДНК, полученных с использованием широкого спектра рестриктаз. В настоящее время практически все векторы содержат так называемый «полилинкер», или поликлонизирующий сайт — несколько тесно расположенных синтетических уникальных (не присутствующих в других частях вектора) сайтов для клонирования. Например, поликлонизирующий сайт в векторе pUC19 состоит из после-



Полилинкер
pUC19

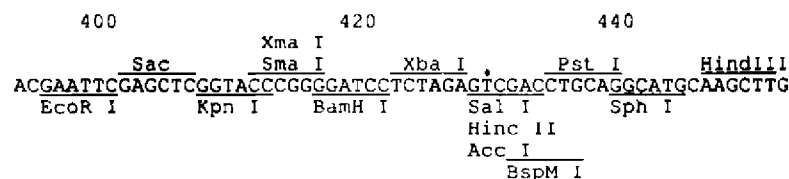


Рис. 13.1. Рестрикционная карта плазмиды pUC18/pUC19 с указанием уникальных сайтов рестрикции. В нижней части рисунка приведен полилинкер плазмиды pUC19.

довательно расположенных сайтов узнавания для 14 рестриктаз [2] (рис. 13.1). Включение полилинкера в ген, кодирующий биологически активную β -галактозидазу, приводит к тому, что встраивание чужеродной ДНК практически всегда сопровождается инактивацией этого фермента. При этом рекомбинантные клоны теряют способность гидролизовать хромогенный субстрат, 5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид (X-gal), и могут быть отобраны из исходных клонов дикого типа с помощью гистохимического

недеструктивного теста. Несущие рекомбинантные плазмиды бактерии образуют при этом колонии белого цвета, а исходные бактериальные клоны — голубого (этот процесс был назван α -комплементацией) [3].

Помимо плазмидных векторов, дающих возможность проводить визуальную идентификацию рекомбинантных клонов с помощью гистохимических тестов, были созданы векторы, позволяющие получать одноцепочечные матрицы для секвенирования ДНК (например, векторы типа pUC и pBluescript [2]), транскрибировать чужеродные последовательности ДНК *in vitro* (например, векторы типа pSP64/65 и его производные [4], векторы pBluescript/pBluescribe [Stratagene, San Diego, USA]) и синтезировать большие количества чужеродных белков [5].

2.2. Получение компетентных клеток *Escherichia coli* и их трансформация бактериальными плазмидами

В основе большинства методов трансформации бактерий лежат данные о том, что обработка бактерий на холоду раствором хлористого кальция и последующее кратковременное нагревание индуцируют у них временное состояние «компетентности», когда они могут поглощать из раствора чужеродную ДНК.

Компетентные клетки *E. coli* можно либо приобрести у коммерческих фирм (BRL, Gaithersburg, Maryland, USA), либо получить в лаборатории и использовать их немедленно или заморозить. Коммерческие препараты компетентных клеток обладают высоким качеством и позволяют получить частоту трансформации более 10^8 колоний на 1 мкг сверхспиральной плазмидной ДНК. Однако эти препараты очень дороги.

В протоколе 13.1 описан метод получения компетентных бактериальных клеток, обеспечивающий частоту трансформации $\sim 10^7$ трансформированных колоний на 1 мкг плазмидной ДНК. Он идеально подходит для таких бактериальных штаммов, как JM109, HB101, TG1 и TG2, но с его помощью можно трансформировать примерно с такой же частотой практически любой бактериальный штамм. Такая эффективность трансформации достаточно высока для осуществления всех рутинных операций клонирования в плазмидах, однако, например, для получения плазмидных библиотек кДНК, синтезированных на редких мРНК, нужна более высокая частота трансформации и необходимы альтернативные методы.

Метод, описанный в работе [7], позволяет получать компетентные культуры клеток *E. coli* штаммов DH1, DH5 и MM294, для

которых частота трансформации достигает $7,5 \cdot 10^8$ колоний на 1 мкг сверхспиральной плазмидной ДНК. Более высокую частоту (10^9 – 10^{10}) можно получить только с помощью электропорации. Этот метод разрабатывался для введения ДНК в клетки эукариот, но недавно его использовали и для трансформации *E. coli*. Необходимые для электропорации специальный высоковольтный мини-электрод и кювета для образца вместе с детальным описанием процедуры трансформации поставляются фирмой Bio-Rad.

Успешное получение компетентных клеток с помощью описанного в протоколе 13.1 метода зависит от нескольких факторов. Особое внимание следует обратить на:

- а) плотность культуры бактериальных клеток;
- б) поддержание во время всех процедур температуры на уровне 0–4 °C.

Протокол 13.1. Получение компетентных клеток *E. coli* обработкой хлористым кальцием

Материалы

- 0,1 М CaCl_2
- Диметилсульфоксид (ДМСО)
- Среда LB: 10 г бакто-триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 10 г NaCl растворяют в 1 л деионизованной воды и доводят pH до 7,0 с помощью 5 М NaOH . Стерилизуют автоклавированием в жидком цикле.
- Для получения LB-агара на 1 л среды добавляют 15 г агара Difco и стерилизуют автоклавированием, как описано выше.
- Среда SOB: 20 г бакто-триптона, 5 г дрожжевого экстракта, 0,5 г NaCl растворяют в 950 мл деионизованной воды, добавляют 10 мл 250 мМ HCl , доводят pH до 7,0 с помощью 5 М NaOH и доводят объем до 1 л. Стерилизуют, как описано выше.
- Среда SOC: идентична среде SOB за исключением того, что содержит также 20 мМ глюкозу. После автоклавирования среды SOB ее охлаждают и добавляют 20 мл 1 М стерилизованной фильтрацией глюкозы.

Методика

1. Снимают одиночную бактериальную колонию с чашки с LB-агаром, инкубированной при 37 °C в течение 16–20 ч, и переносят ее в 10 мл LB-среды в пробирке на 20 мл. Инкубируют при 37 °C и сильной аэрации (200 об/мин на круговом шейкере) в течение ночи.

2. 1 мл полученной ночной культуры вносят в 100 мл среды LB, налитой в колбу на 1 л, и инкубируют ее при 37 °С и сильной аэрации (200 об/мин на круговом шейкере) в течение примерно 2 ч до достижения плотности $\sim 10^8$ клетка/мл ($OD_{600} \sim 0,4$).
3. Переносят культуру в стерильные охлажденные центрифужные пробирки на 50 мл (Falcon 2070) и охлаждают до 0 °С инкубацией во льду в течение 10 мин.
4. Собирают клетки центрифугированием (ротор Sorvall GS3 или аналогичный) при 4300 g в течение 5 мин при 4 °С.
5. Сливают надосадоk и переворачивают пробирку на 1 мин для полного его стекания.
6. Ресуспенсируют клеточный осадок в 10 мл ледяного 0,1 М $CaCl_2$ при осторожном встряхивании и инкубируют клетки во льду в течение 30 мин.
7. Собирают клетки центрифугированием (ротор GS3 или аналогичный) при 4300 g в течение 5 мин при 4 °С.
8. Сливают супернатант и переворачивают пробирку на 1 мин, с тем чтобы супернатант полностью стек.
9. Ресуспенсируют каждый осадок в ледяном 0,1 М $CaCl_2$ (из расчета 2 мл на 50 мл исходного объема культуры). До использования суспензию лучше оставить на 1 ч при 4 °С; при 4 °С ее можно хранить до 48 ч (но после 24 ч хранения эффективность трансформации будет снижаться). Суспензию можно разлить на аликвоты и хранить при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}^{1)}$.
10. С помощью охлажденного стерильного наконечника для микропипетки переносят по 200 мл каждой суспензии в стерильную полипропиленовую пробирку (Falcon 2059 17 × 100 мм). Добавляют сверхспиральную плазмидную ДНК (не более 50 нг в объеме не более 10 мкл), осторожно перемешивают и 30 мин инкубируют во льду.

Контроли

- Компетентные клетки, к которым добавлено известное количество (от 1 до 20 нг) сверхспиральной плазмидной ДНК.
 - Компетентные клетки, к которым плазмидная ДНК не добавлялась.
11. Переносят пробирки ровно на 90 с в водяную баню на 42 °С. Пробирки при этом не встряхивают.
 12. Быстро переносят пробирки обратно в лед и инкубируют 2 мин.
 13. Добавляют в каждую пробирку 800 мкл среды SOC и для индукции экспрессии кодируемого плазмидой маркера устойчивости к антибиотикам инкубируют их при умеренной аэрации (100 об/мин) в течение 45 мин при 37 °С.

Протокол 13.1 (Продолжение)

14. Переносят до 200 мкл трансформированных компетентных клеток в содержащие соответствующий антибиотик чашки Петри диаметром 90 мм с LB- или SOB-средой. Равномерно распределяют трансформированные клетки по поверхности агара стерильной изогнутой стеклянной палочкой.
15. Оставляют чашки при комнатной температуре до подсыхания.
16. Переворачивают чашки и инкубируют их при 37 °С. Колонии становятся видимыми через 12–16 ч.

¹⁾ Хранение компетентных клеток.

- (а) Добавляют к 2 мл ресуспандированных клеток 70 мкл ДМСО, аккуратно перемешивают и помещают суспензию на 15 мин в лед.
- (б) Добавляют к каждой суспензии еще 70 мкл ДМСО, опять аккуратно перемешивают и помещают суспензию в лед.
- (в) Быстро разливают суспензию порциями по 50 мкл в охлажденные стерильные микроцентрифужные пробирки и замораживают компетентные клетки в жидком азоте. До использования хранят пробирки при -70 °С.
- (г) При необходимости суспензию размораживают, подержав пробирку в руках, и помещают в лед как минимум на 10 мин.

2.3. Выделение и очистка плазмидной ДНК

2.3.1. Введение

Для выделения плазмид разработано несколько методов. Они различаются по чистоте конечного продукта, скорости выделения и возможности их использования для выделения плазмид из большого («maxiprep») и промежуточного («midiprep») объемов бактериальной культуры или для одновременного выделения плазмидной ДНК из большого числа культур малого объема («miniprep»).

Почти всегда для выделения плазмид используют культуры, растущие в содержащей соответствующий антибиотик жидкой среде и полученные наращиванием одной снятой с агара бактериальной колонии. Если плазмидные векторы (например, pUC) реплицируются в клетке с образованием большого числа копий, то соответствующие плазмиды можно получить в больших количествах из культур, выращенных в стандартной LB-среде до достижения поздней логарифмической фазы (примерно 18 ч). Однако если используемый вектор реплицируется не столь бесконтрольно (как, например, плаزمида pBR322), его приходится селективно амплифицировать инкубацией бактериальной культуры в течение нескольких часов в среде с хлорамфениколом (170 мкг/мл). Хлорамфеникол ингибирует синтез белков клетки-хозяина и тем са-

мым нарушает репликацию бактериальной хромосомы. При этом репликация плазмид продолжается еще в течение нескольких часов, что позволяет значительно увеличить выход плазмидной ДНК по сравнению с неамплифицированными культурами.

2.3.2. Основные методы

Большинство методов выделения плазмид основаны на том, что последние имеют ковалентно замкнутую кольцевую форму (ССС) и гораздо меньшие размеры, чем бактериальная хромосома. Бактериальные клетки собирают центрифугированием и лизируют, обычно с помощью ЭДТА и лизоцима, разрушающего клеточную стенку. Можно также использовать органические растворители, нагревание, неионные детергенты [9]. Фрагменты клеток и бактериальной хромосомы после лизиса удаляют центрифугированием.

Чаще всего при работе с культурами любого объема — как малого, так и большого — используется предложенный в работе [10] щелочной метод выделения. В присутствии щелочи основная масса загрязняющих плазмидную ДНК фрагментов хромосомной ДНК, белков и РНК выпадает в осадок, так что получаемые препараты плазмидной ДНК оказываются достаточно чистыми для обработки рестриктирующими эндонуклеазами и последующего клонирования. Для дальнейшей очистки выделенной плазмидной ДНК можно провести центрифугирование в равновесном градиенте плотности в присутствии красителя.

а. Щелочной метод

В основе метода лежит то, что в щелочных условиях (при $\text{pH} \sim 12$) происходит денатурация только линейных молекул ДНК (т. е. разделение цепей двухцепочечной ДНК клетки-хозяина), плазмидные же ССС-молекулы не денатурируют. При нейтрализации клеточного экстракта в присутствии солей высокой концентрации денатурированная хромосомная ДНК выпадает в осадок, поскольку реассоциация длинных линейных одноцепочечных молекул ДНК происходит в этих условиях одновременно во множестве участков с образованием нерастворимых комплексов. Клеточная РНК и белки тоже осаждаются вследствие того, что при осаждении используется детергент ДСН. В протоколе 13.2 описан в деталях вариант этого метода для выделения небольших количеств плазмидной ДНК из *E. coli* K12, а в протоколе 13.3 — метод получения больших количеств более чистой плазмидной ДНК, включающий центрифугирование в равновесном градиенте плотности в присутствии красителя.

6. Центрифугирование в равновесном градиенте плотности в присутствии красителя

В присутствии бромистого этидия различие в плавучей плотности плазмидной и хромосомной ДНК становится еще более значительным. Связываясь с линейной двухцепочечной ДНК, этот краситель встраивается между плоскостями оснований (интеркалирует), вызывает расплетание двойной спирали, увеличивает длину линейных фрагментов хромосомной ДНК и приводит к снижению ее плавучей плотности. В плазмидной ССС-ДНК интеркаляция красителя вызывает образование компенсаторных сверхспиральных витков, и при достаточно большом их числе встраивание следующих молекул бромистого этидия становится невозможным.

При равновесном центрифугировании в градиенте насыщенного раствора хлористого цезия в присутствии бромистого этидия плазмидная ДНК имеет более высокую плавучую плотность, чем хромосомная, и концентрируется в полосе, расположенной ниже, чем полоса хромосомной ДНК. Обычно эта полоса имеет красный цвет и ее не нужно визуализировать в УФ-свете. РНК при центрифугировании осаждается на дне пробирки.

Чтобы отобрать плазмидную ДНК после центрифугирования, пробирку прокалывают сбоку на нужной высоте иглой, надетой на шприц, и отсасывают материал. Обычно препарат плазмидной ДНК после центрифугирования в равновесном градиенте плотности в присутствии красителя содержит очень мало РНК и белков и они не влияют на последующие манипуляции с плазмидной ДНК. При необходимости примеси белков можно удалить экстракцией фенолом/хлороформом (см. протокол 13.10), а примеси РНК — центрифугированием или хроматографией [12]. Если провести ультрацентрифугирование не удастся, то процедуру выделения из больших объемов культуры (протокол 13.3) можно довести до п. 8, а потом до переосаждения этанолом удалить белковые примеси, как это описано в протоколе 13.10.

Протокол 13.2. Выделение плазмидной ДНК из небольшого объема бактериальной культуры

Материалы

- Раствор I: 50 мМ глюкоза, 25 мМ трис-НСl, рН 8,0, 10 мМ ЭДТА. Хранить при 4 °С.
- Раствор II: 0,2 М NaOH, 1,0% (о/о) ДСН. Раствор можно хранить при комнатной температуре не более недели.

- Раствор III: 60 мл 5 М ацетата аммония, 11,5 мл ледяной уксусной кислоты, 28,5 мл H_2O . Полученный в результате раствор является 3 М по ионам аммония и 5 М по ацетат-ионам.
- Раствор IV: 100 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 10 мМ трис-HCl, pH 7,5.

Методика

1. Одну бактериальную колонию (полученную в результате эксперимента по трансформации, как это описано в протоколе 13.1, или ранее расштрихованную из хранящейся в глицерине бактериальной культуры) вносят в неплотно закрытую пробирку на 15 мл с 2 мл LB-среды, содержащей соответствующий антибиотик¹⁾. Растят бактериальную культуру при интенсивном встряхивании (200 об/мин) при 37 °C в течение ночи до $OD_{600} = 1,0$.
2. Переносят 1,5 мл культуры в микроцентрифужную пробирку и собирают клетки центрифугированием при 12 000 g в течение 1 мин. Оставшуюся культуру хранят при 4 °C.
3. Отсасывают супернатант и при интенсивном встряхивании ресуспендируют осадок бактериальных клеток в 100 мкл холодного раствора I. Инкубируют во льду 15 мин.
4. Добавляют 200 мкл раствора II и перемешивают смесь быстрым пятикратным переворачиванием закрытой пробирки без встряхивания. Инкубируют пробирку во льду 5 мин.
5. Добавляют 150 мкл буфера III, закрывают пробирку и перемешивают содержимое осторожным встряхиванием в течение 10 с. Инкубируют во льду 10 мин.
6. Центрифугируют на микроцентрифуге при 12 000 g в течение 5 мин при 4 °C и отбирают супернатант в новую пробирку.
7. Для осаждения двухцепочечной ДНК добавляют 1 мл холодного этанола, перемешивают встряхиванием и на 30 мин помещают на -20 °C.
8. Центрифугируют на микроцентрифуге при 12 000 g в течение 5 мин при 4 °C.
9. Осторожно отбирают супернатант и ресуспендируют осадок в 100 мкл раствора IV.
10. Добавляют 200 мкл этанола, перемешивают и на 10 мин помещают на -20 °C. Центрифугируют на микроцентрифуге при 12 000 g в течение 2 мин при 4 °C.
11. Отбирают супернатант, добавляют к осадку 1 мл этанола, центрифугируют на микроцентрифуге при 12 000 g в течение 2 мин при 4 °C.

Протокол 13.2 (Продолжение)

12. Отбирают супернатант, осадок нуклеиновых кислот подсушивают на воздухе в течение 10 мин. Растворяют нуклеиновые кислоты в 50 мкл ТЭ²⁾ и хранят при -20°C .

¹⁾ Состав среды LB приведен в протоколе 13.1.

²⁾ Буфер ТЭ: 10 мМ трис-НСl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА.

Обычно метод, описанный в протоколе 13.2, дает при выделении многокопийных плазмид типа pUC выход 3–5 мкг ДНК на 1 мл исходной бактериальной культуры. Если полученные таким способом мини-препараты ДНК не удастся рестрицировать, то для удаления загрязнений можно провести экстракцию фенолом/хлороформом (протокол 13.10). Пропорционально увеличив количество всех необходимых реактивов, можно использовать данный метод для выделения ДНК из культур объемом до 10 мл.

Протокол 13.3. Выделение плазмидной ДНК из больших объемов бактериальных культур

1. Инокулируют 30 мл среды LB¹⁾ (содержащей соответствующий антибиотик) 1/100 ее объема (300 мкл) ночной культуры, полученной из одной бактериальной колонии, содержащей интегрисующую плазмиду.

Выращивают бактериальную культуру при 37°C со встряхиванием (200 об/мин) до поздней логарифмической фазы (для достижения $\text{OD}_{600} \sim 0,6$ необходимо 2–3 ч).

2. Инокулируют 500 мл нагретой до 37°C и содержащей соответствующий антибиотик среды LB¹⁾, налитой в колбу на 2 л, 25 мл культуры, полученной на первом этапе. Инкубируют при 37°C при интенсивном встряхивании (200 об/мин) в течение 2,5 ч. OD_{600} по окончании инкубации должно составлять $\sim 1,0$.

- **Дополнительный этап:** для выделения низкокопийных плазмид (типа pBR322) к культуре добавляют 2,5 мл хлорамфеникола (34 мг/мл в этаноле) до конечной концентрации в культуре 170 мкг/мл.

3. Растят культуру еще 12–16 ч (обычно в течение ночи) при 37°C при интенсивном встряхивании (200 об/мин).

4. Собирают бактериальные клетки центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин (ротор Sorvall GSA или его аналог). Сливают супернатант, центрифужные стаканы переворачивают и дают супернатанту полностью стечь.

5. Ресуспендируют при встряхивании осадок бактериальных клеток в 10 мл содержащего лизоцим (2 мг/мл) буфера I²⁾ и инкубируют их 10 мин во льду.
6. Добавляют 20 мл раствора II²⁾, закрывают центрифужный стакан и тщательно перемешивают его содержимое, несколько раз перевернув стакан. Инкубируют 5 мин во льду.
7. Добавляют 20 мл холодного раствора III²⁾, закрывают центрифужный стакан и тщательно перемешивают его содержимое встряхиванием. Инкубируют во льду от 10 до 20 мин. За это время должен образоваться рыхлый белый осадок, содержащий хромосомную ДНК, РНК и белково-мембранные комплексы.
8. Бактериальный лизат центрифугируют при 10 000 g в течение 10 мин при 4 °C (ротор GS3 или его аналог).
9. Супернатант фильтруют через марлю в центрифужный стакан на 250 мл, добавляют 0,6 объема изопропанола, хорошо перемешивают и для образования осадка нуклеиновых кислот помещают на -20 °C на 20 мин.
10. Осадок нуклеиновых кислот собирают центрифугированием при 10 000 g в течение 10 мин при 4 °C (ротор Sorvall GS3 или его аналог).
11. Осторожно сливают супернатант, переворачивают пробирку и дают полностью стечь супернатанту (примерно 30 мин при комнатной температуре).
12. Растворяют осадок нуклеиновых кислот в 8,8 мл ТЭ³⁾.
13. К 8,8 мл ресуспендированного осадка добавляют сухой CsCl из расчета 1 г на 1 мл раствора ДНК, аккуратно перемешивают до растворения CsCl, добавляют 0,4 мл раствора бромистого этидия (10 мг/мл в воде).
14. С помощью пастеровской пипетки или одноразового шприца переносят красный прозрачный раствор в быстрозаплавляемую пробирку Beckman (или аналогичную) и заполняют ее доверху легким минеральным маслом. Заплавливают пробирку согласно указаниям фирмы-изготовителя и центрифугируют при 100 000 g в течение 40 ч при 20 °C (например, в роторе Beckman 50Ti). Можно использовать угловые и вертикальные роторы других фирм (например, Beckman 70Ti; в этом случае центрифугирование проводят при 250 000 g в течение 16 ч). Пробирки должны быть уравновешены с точностью до 0,02 г.

Протокол 13.3 (Продолжение)

15. Чтобы отобрать плазмидную ДНК, прокалывают верхнюю часть пробирки с помощью иглы для подкожных инъекций № 19, чтобы в пробирку вошел воздух. Затем вводят иглу № 21, надетую на шприц на 2 мл (скошенной стороной вверх), в нижнюю окрашенную в красный цвет зону, отбирают плазмидную ДНК и переносят ее в стерильную пробирку. Если количество плазмидной ДНК невелико, то для ее визуализации пробирку освещают длинноволновым УФ-светом.
16. Бромистый этидий экстрагируют с помощью насыщенного водой изобутилового спирта. Для этого к раствору плазмидной ДНК добавляют равный объем насыщенного изобутилового спирта, перемешивают и отбирают верхний слой. Операцию повторяют до тех пор, пока изобутиловый спирт не перестанет окрашиваться.
17. Для удаления из раствора ДНК CsCl добавляют равное количество воды и переосаждают ДНК двумя объемами этанола при 4 °C в течение 15 мин. Плазмидную ДНК собирают центрифугированием при 10 000 g в течение 15 мин при 4 °C (ротатор Sorvall SS34 или его аналог); осадок ДНК растворяют примерно в 1 мл ТЭ. Определяют OD_{260} конечного раствора ДНК и рассчитывают его концентрацию (см. гл. 12). Разливают раствор ДНК на аликвоты и хранят при -20 °C.

¹⁾ Состав этих растворов приведен в протоколе 13.1.

²⁾ Состав этих растворов приведен в протоколе 13.2.

³⁾ Буфер ТЭ: 10 mM трис-HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА.

3. Мечение нуклеиновых кислот

3.1. Введение

Возможность применения таких методов, как Саузерн- и Нозерн-блот-гибридизация (гл. 14), дот-блот-гибридизация (гл. 14), гибридизация на колониях и фаговых бляшках, картирование с помощью нуклеазы S1/РНКазы [21], гибридизация *in situ* [13], определяется тем, есть ли достаточно простой способ мечения клонированных фрагментов ДНК или их РНК-копий. Чтобы выбрать оптимальную для каждого случая метку и способ мечения, надо учитывать ряд факторов.

Прежде всего тип метки определяется чувствительностью и разрешением, которые хотят получить. Существенны и другие факторы: стабильность зондов, безопасность и простота работы, стоимость.

3.2. Радиоактивное мечение по сравнению с нерадиоактивным

Традиционно для получения РНК- или ДНК-зондов используют радиоактивно меченные с помощью ^{32}P , ^{35}S , ^{125}I , ^3H нуклеотиды, которые после гибридизации зонда с нуклеиновой кислотой-мишенью выявляют методом радиоавтографии. Однако большинство этих изотопов имеют малый период полураспада (^{32}P — 14,3 сут, ^{35}S — 87,4 сут), что влечет за собой необходимость частого приготовления зондов. Кроме того, работа с радиоизотопами требует соблюдения строгих мер безопасности, а мероприятия по захоронению радиоактивных отходов очень дороги. Поиски эффективных нерадиоактивных маркеров, пригодных для мечения зондов, привели к созданию как минимум двух альтернативных меток: биотин-dNTP (bio-dNTP, фирмы Sigma и Gibco-BRL) и дигоксигенин-dUTP (dig-dUTP, фирма Boehringer Mannheim). Некоторые авторы, однако, считают, что неизотопные методы мечения не обеспечивают столь высокой чувствительности, специфичности и воспроизводимости результатов, как изотопные, особенно при гибридизации на фильтрах. Впрочем, это не относится к гибридизации *in situ*.

В основе большинства методов нерадиоактивного мечения лежат ферментативные реакции с участием нуклеозидтрифосфатов, ковалентно связанных с молекулой-свидетелем (обычно биотином). После гибридизации нерадиоактивно меченные зонды можно выявить с помощью иммунологической системы детекции на основе авидина и стрептавидина (имеющих высокое сродство к биотину) или с помощью конъюгированных с флуоресцентным красителем или ферментом антител к зонду. Для визуализации меченых гибридных молекул проводят инкубацию конъюгированных с ферментом антител с соответствующим субстратом [14].

Зонды можно метить и химическими методами, используя биотин, пришитый к высокоактивным молекулам. Такие биотинилированные субстраты (например, фотобиотин [15], биотингидразид [16], эфир биотина [17]) могут вступать в реакцию с одной из функциональных групп нуклеиновых кислот (например, с аминогруппой). Однако, чтобы эти методы могли конкурировать с ферментативными методами мечения, необходимо доказать, что они обеспечивают адекватные чувствительность и воспроизводимость.

К сожалению, биотин присутствует в большинстве тканей, так что даже при ферментативном мечении зондов биотином (особенно если эти зонды используются для гибридизации *in situ*) могут

возникать побочные неспецифичные реакции. Кроме того, используемые для выявления гибридных молекул авидин и стрептавидин имеют тенденцию к неспецифическому связыванию с тканями и фильтрами (особенно с сильно заряженными нейлоновыми), что неизбежно усиливает фон. Тем не менее разработано много эффективных методов выявления нуклеиновых кислот при гибридизации *in situ* с биотинилированными зондами.

Использование в качестве метки дигоксигенина, по-видимому, обеспечивает большую специфичность и воспроизводимость, а чувствительность метода близка к таковой для случая радиоактивно меченных зондов [18]. Дигоксигенин присутствует только в растении дигиталис, что уменьшает неспецифичное окрашивание, обусловленное взаимодействием с эндогенными соединениями.

В данной главе описаны быстрые и легко выполнимые процедуры ферментативного мечения нуклеиновых кислот радиоактивными изотопами. В каждом случае указывается, какие модификации в них следует внести, если в качестве метки предполагается использовать биотин или дигоксигенин. Наборы для мечения ДНК выпускают фирмы Pharmacia и Amersham (радиоактивные изотопы) и BRL и Boehringer Mannheim (нерадиоактивные метки).

3.3. Основные методы

В основе всех описанных методов лежат соответствующие ферментативные реакции. Отметим несколько общих правил, помогающих достичь высокой эффективности мечения и воспроизводимости результатов.

Реактивы должны вноситься в реакционную смесь в строгом соответствии с протоколом. Чтобы уменьшить число манипуляций с радиоактивными растворами, меченые соединения следует вносить предпоследними, непосредственно перед добавлением фермента. Очень важно тщательно перемешать все реактивы перед добавлением фермента (непродолжительным встряхиванием с последующим центрифугированием на микроцентрифуге при 12 000 *g* в течение 2 с). Смешивание реакционной смеси с ферментом проводят осторожным двух- или трехкратным пипетированием. Низкий уровень мечения обычно обуславливается загрязнением препаратов ДНК (или РНК). В этом случае можно провести очистку фенолом и переосаждение этанолом (протокол 13.10). Эффективность мечения повышается также при увеличении времени реакции или использовании больших количеств фермента.

Если метод мечения только отрабатывается или если используются новые препараты, очень важно определить эффективность мечения. В протоколе 13.4 описана обычно используемая при работе с радиоактивно мечеными зондами процедура — осаждение трихлоруксусной кислотой (ТХУ). Параллельные пробы обычно берут несколько раз по ходу реакции или по ее окончании, а исходный уровень нерастворимого в ТХУ радиоактивного материала определяют до момента добавления фермента. Если метод уже отработан, то эффективность включения метки можно не определять. В случае нерадиоактивных зондов уровень включения метки и средний размер фрагментов можно определить сравнением с известными мечеными стандартами с помощью Саузерн-блоттинга (гл. 14). Невключившуюся метку при необходимости удаляют, как это описано в протоколе 13.5. Как показывает наш опыт, такая очистка приводит к снижению фона при гибридизации на фильтрах и *in situ*.

Протокол 13.4. Определение уровня включения нуклеотидтрифосфатов в ДНК преципитацией в ТХУ

Материалы

- Фильтровальная бумага ватман 540
- 5% трихлоруксусная кислота, 1% пиродифосфат натрия (раствор ТХУ). **ВНИМАНИЕ!** Кислота едкая.

Методика

1. На небольшой подписанный карандашом кусочек фильтровальной бумаги ватман 540 наносят 0,5 мкл реакционной смеси для мечения.
2. При работе с ^{32}P -зондами определяют радиоактивность фильтра, используя эффект Черенкова (т. е. без сцинтиллятора). Это позволяет определить суммарную активность образца. Если определяется уровень включения ^{35}S или ^3H , то фильтры высушивают и определяют радиоактивность с помощью сцинтилляционного счетчика. Для промывания ТХУ используют второй такой же фильтр.
3. Промывают фильтр в 20 мл раствора ТХУ в одноразовой пробирке с закручивающейся крышкой, сливают раствор и заливают фильтр свежей порцией раствора. Процедуру повторяют как минимум пять раз, пока не прекратится смывание с фильтра радиоактивных веществ.

Протокол 13.4 (Продолжение)

4. Высушивают фильтр и еще раз измеряют его радиоактивность, используя эффект Черенкова, чтобы определить число импульсов в кислотонерастворимой фракции (включившуюся в зонд метку).
5. Рассчитывают процент включения по следующим формулам:

Процент включения =

$$= \frac{\text{Число импульсов в кислотонерастворимой фракции}}{\text{Общее число импульсов}} \times 100$$

Удельная радиоактивность —

$$= \frac{\text{Суммарная включившаяся метка}}{\text{Масса образца, взятого для гибридизации}}$$

Протокол 13.5. Очистка от невключившихся нуклеотидов

Для очистки от невключившихся нуклеотидов используют два метода.

А. Переосаждение этанолом

Материалы

- 200 мМ ЭДТА, рН 8,0
- 2,5 М ацетат натрия, рН 5,0
- Носитель (ДНК, РНК или гликоген в концентрации 10 мг/мл)
- Холодный этанол
- Буфер ТЭ: 10 мМ трис-НСI, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА

Методика

Все описанное ниже относится к реакции мечения, проводимой в объеме 50 мкл. Если реакция проводится в других условиях, то необходимо пропорционально увеличить или уменьшить объем используемых реактивов.

1. К 50 мкл смеси, в которой проводилось мечение, добавляют:

- | | |
|-------------------------------|---------|
| • 0,2 М ЭДТА, рН 8,0 | 5 мкл |
| • 2,5 М ацетат натрия, рН 5,0 | 5 мкл |
| • Носитель (20 мкг) | 2 мкл |
| • Холодный этанол | 200 мкл |

Полученную смесь перемешивают и охлаждают в сухом льду до -70°C или оставляют на ночь при -20°C .

2. Собирают нуклеиновые кислоты центрифугированием в микроцентрифуге при 12 000 g в течение 15 мин и осторожно отбирают супернатант (если он радиоактивен, то для захоронения его собирают в пустую пробирку или колбу).
3. Промывают осадок холодным абсолютным или 70% этанолом, повторяют центрифугирование при описанных выше условиях, отбирают супернатант и полученный осадок подсушивают на воздухе.
4. Для последующего использования в качестве зонда растворяют осадок меченой ДНК в нужном объеме ТЭ.

Б. Центрифугирование на колонках с сефадексом

Материалы

- Одноразовый шприц на 1 мл
- Сефадекс G-50—G-300, уравновешенный буфером для промывания колонки
- Носитель (ДНК, РНК или гликоген в концентрации 10 мг/мл)
- Буфер для промывания колонки: 10 мМ ЭДТА, 150 мМ NaCl, 0,1% ДСН, 50 мМ трис-HCl, pH 7,5

Методика

1. На дно одноразового шприца на 1 мл кладут небольшой кусочек ваты.
2. Осторожно, не внося пузырьков воздуха, заполняют шприц сефадексом G-50—G-300.
3. Помещают шприц в центрифужную пробирку на 15 мл, накладывают 5 мкл носителя и пропускают буфер для промывания (4 раза по 250 мкл).
4. Центрифугируют шприц в пробирке при 1600 g 4 мин и удаляют элюат со дна пробирки.
5. На дно центрифужной пробирки помещают пробирку на 1 мл с завинчивающейся крышкой.
6. Наносят на колонку меченую ДНК и центрифугируют ее 4 мин при 1600 g.
7. Вынимают пробирку на 1 мл, в которой содержится элюированный зонд; невключившиеся нуклеотиды после центрифугирования остаются в шприце.

4. Мечение двухцепочечной ДНК

4.1. Метод нуклеотидного замещения (ник-трансляция)

Ник-трансляция [19] осуществляется при участии двух ферментов: панкреатической дезоксирибонуклеазы (ДНКазы I) и ДНК-полимеразы I *E. coli* (ДНК pol I). ДНКаза I вносит случайные разрывы в обе цепи двухцепочечной молекулы, при этом в каждой точке разрыва образуются свободная гидроксильная группа на 3'-конце и свободная фосфатная — на 5'-конце. Далее с 5'-стороны от точки разрыва происходит последовательное отщепление нуклеотидов за счет 5'→3'-экзонуклеазной активности ДНК-полимеразы I и одновременно за счет 5'→3'-полимеразной активности этого же фермента — присоединение нуклеотидов к свободному 3'-гидроксильному концу. В итоге точка разрыва перемещается вдоль молекулы ДНК. Схематически этот процесс представлен на рис. 13.2. Заменяя обычные нуклеотиды одного или более типов на радиоактивно меченные, можно получить ДНК с высокой удельной радиоактивностью. Условия, в которых проводится ник-трансляция, можно варьировать, получая тем самым меченые фрагменты разного размера и удельной радиоактивности и разное общее количество меченого зонда.

Описанная в протоколе 13.6 процедура относится к случаю, когда для мечения зонда используются ^{32}P -dNTP, но она пригодна и для таких меток, как ^3H или ^{35}S , а также для нерадиоактивных молекул-свидетелей биотина и дигоксигенина.

Эффективность включения метки при ник-трансляции должна превышать 60%, при этом удельная радиоактивность зонда обычно составляет $5 \cdot 10^8$ расп./мин на 1 мкг.

Протокол 13.6. Мечение ДНК с помощью ник-трансляции

А. Радиоактивное мечение

Материалы

- 10 × буфер для ник-трансляции (10 × НК-буфер): 500 мМ трис-НСl, рН 7,6, 50 мМ MgCl_2 , 10 мМ 2-меркаптоэтанол
- ТЭ-буфер: 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА
- Стоп-буфер: 300 мМ ЭДТА, рН 8,0
- 10 × dNTP: по 200 мкМ каждого из трифосфатов (dATP, dGTP, dTTP) в ТЭ, рН 8,0
- ДНКаза I: 100–500 пг/мкл
- ДНК-полимераза I: 2 ЕД/мкл

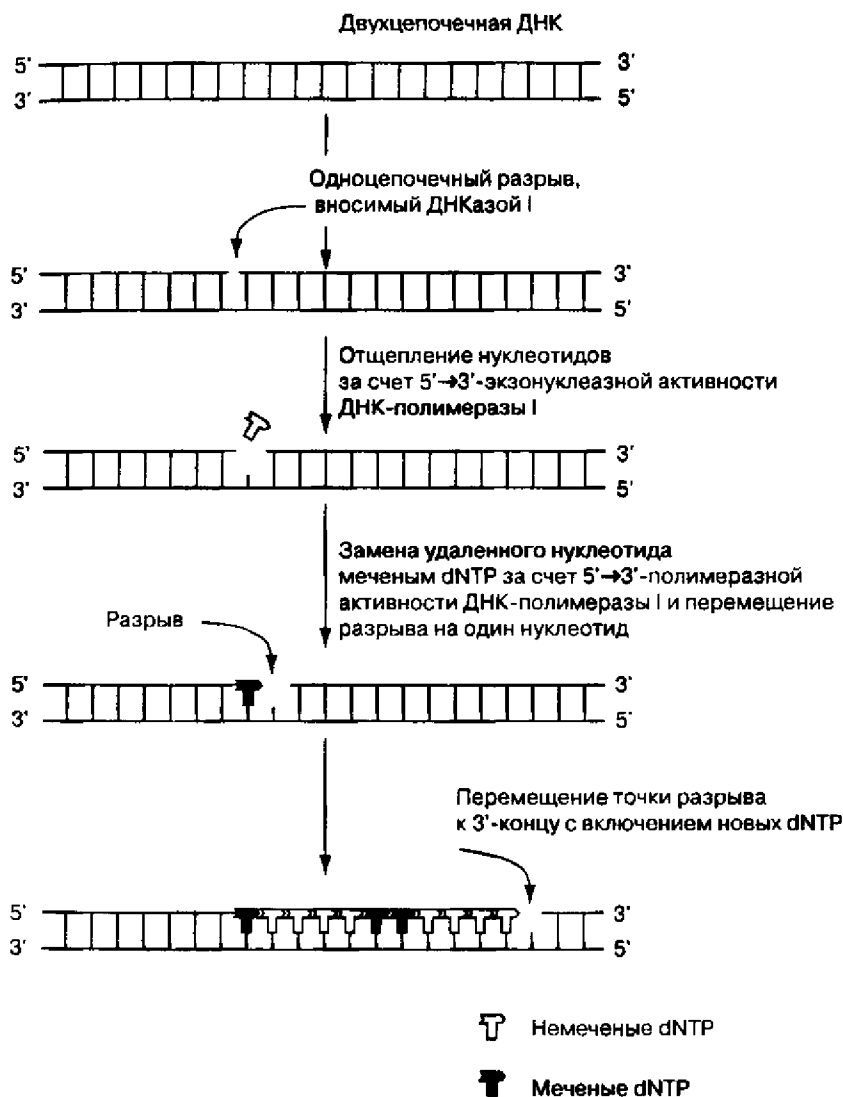


Рис. 13.2. Ник-трансляция ДНК.

Протокол 13.6 (Продолжение)

- [α - 32 P]dCTP (удельная радиоактивность > 3000 Ки/ммоль, 110 ТБк/ммоль, 10 мКи/мкл)

Методика

1. В помещенную в лед микроцентрифужную пробирку на 0,5 мл вносят следующие реактивы:

• ДНК	50–500 нг
• 10 × НК-буфер	5 мкл
• 10 × dNTP	5 мкл
• Вода до конечного объема	50 мкл
• [α - 32 P]dCTP	5 мкл
• ДНКазы I	2 мкл (0,4–1,0 нг/мкг ДНК)
• ДНК-полимераза I	2 мкл (4 ЕД)

Перемешивают все компоненты аккуратным встряхиванием пробирки и центрифугируют смесь при 12 000 g в течение 2 с, осаждая содержимое пробирки на дно.

2. Помещают пробирку в водяную баню на 15 °С примерно на 2 ч.
3. Останавливают реакцию, добавив 5 мкл стоп-буфера, и не-включившиеся нуклеотиды удаляют переосаждением этанолом или хроматографией на сефадексе (см. протокол 13.5).
4. Перед проведением гибридизации зонд денатурируют, прогревая в течение 5 мин при температуре 95–100 °С, затем в течение 5 мин охлаждают во льду. После этого зонд можно хранить при –20 °С в течение нескольких суток.

Б. Нерadioактивное мечение

Материалы

Для биотина:

- 10 × dNTP: по 200 мкМ каждого из трифосфатов (dGTP, dCTP, dTTP) в ТЭ, pH 8,0
- Bio-7-dATP: 0,4 мМ

Для дигоксигенина:

- 10 × dNTP: по 200 мкМ каждого из трифосфатов (dATP, dGTP, dTTP) и 130 мкМ dTTP в ТЭ, pH 8,0
- Dig-11-dUTP: 1 мМ

Методика

1. В находящуюся во льду микроцентрифужную пробирку на 0,5 мл вносят следующие реактивы:

• ДНК	1 мкг
• 10 × НК-буфер	5 мкл
• 10 × dNTP	5 мкл
• Вода до конечного объема	50 мкл
• 0,4 мМ bio-7-dATP	2,5 мкл
или 1,0 мМ dig-11-dUTP	1 мкл
• ДНКазы I	2 мкл (0,4–1,0 нг/мкг ДНК)
• ДНК-полимераза I	2 мкл (4 ЕД)

2. Перемешивают все компоненты аккуратным встряхиванием пробирки и центрифугируют при 12 000 g в течении 2 с, собирая содержимое пробирки на дне. Проводят все операции, описанные в протоколе для радиоактивного мечения зондов, начиная с п. 2. Разлитый на небольшие аликвоты раствор меченого зонда можно хранить при -70°C в течение нескольких месяцев, но рабочий раствор хранят при 4°C .

Метод ник-трансляции непригоден для мечения одноцепочечной ДНК, но одинаково эффективен в случае линейной и кольцевой двухцепочечной ДНК. Число вносимых в ДНК разрывов, а следовательно, и размер получаемых одноцепочечных меченых фрагментов зависит от концентрации ДНКазы I. Описанный выше метод позволяет получать меченые одноцепочечные фрагменты длиной 200–500 нуклеотидов, оптимальной для гибридизации на фильтрах.

В первые часы реакции включение радиоактивной метки линейно зависит от времени инкубации.

4.2. Метод рассеянной затравки

В основе метода рассеянной затравки, как и метода ник-трансляции, лежит синтез новой, комплементарной матрице цепи с помощью ДНК-полимеразы при наличии свободной 3'-гидроксильной группы. Свободную 3'-гидроксильную группу «поставляет» короткий олигонуклеотидный праймер, отоженный с матрицей (рис. 13.3). Если праймеры гетерогенны по своей нуклеотидной последовательности, то они будут гибридизоваться с разными участками матрицы, так что все ее нуклеотиды будут копироваться при образовании комплементарных фрагментов с равной вероятностью. В качестве праймеров для получения меченых копий как ДНК, так и РНК используются гексануклеотиды со случайной последовательностью, полученные либо при расщеп-

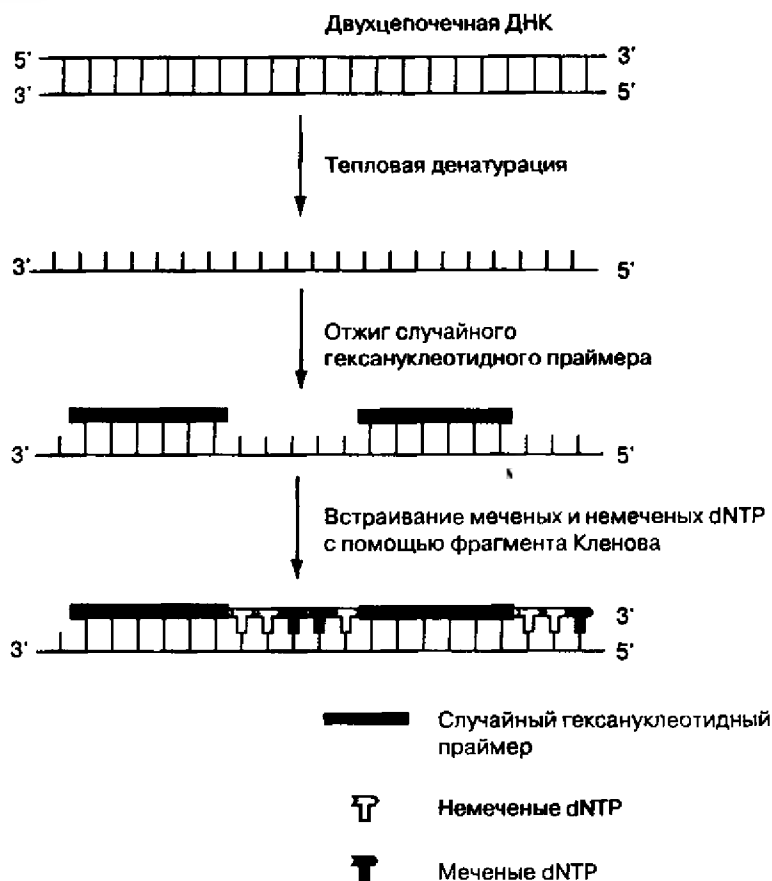


Рис. 13.3. Мечение ДНК методом рассеянной затравки.

лении ДНК тимуса теленка ДНКазой I (Pharmacia, Boehringer Mannheim), либо синтетическим путем (International Biotechnologies).

Тип используемой ДНК-зависимой полимеразы определяется природой матрицы, но в любом случае во избежание деградации праймера полимераз не должна обладать 5'→3'-экзонуклеазной активностью. Для копирования одноцепочечных РНК-матриц используют РНК-зависимую ДНК-полимеразу (обратную транскриптазу), а одноцепочечных ДНК — фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*.

Впервые процедуру получения меченых фрагментов ДНК методом рассеянной затравки с использованием фрагмента Кленова описали Файнберг и Фогельштейн [20]. Этот процесс схематически представлен на рис. 13.3, а в протоколе 13.7 описана методика мечения 25–250 нг одноцепочечной ДНК. Используемую в качестве матрицы одноцепочечную ДНК можно получить либо клонированием в одноцепочечных бактериофагах (типа M13), либо (к этому способу прибегают чаще) с помощью тепловой денатурации двухцепочечных молекул. При этом лучше использовать линейные молекулы ДНК, поскольку кольцевые ДНК быстро ренатурируют. Метод рассеянной затравки пригоден и в том случае, когда имеют дело с недостаточно чистыми препаратами ДНК. Например, можно использовать фрагменты ДНК, выделенные с помощью электрофореза в агарозном геле. Этот метод часто применяется для отделения клонированных вставок от векторных последовательностей, способных к перекрестной гибридизации с ДНК мишени. При этом плазмиды, полученные описанными выше методами, рестриктируют соответствующими ферментами, фракционируют в агарозном геле и очищают клонированные фрагменты ДНК [12]. Кроме того, Файнберг и Фогельштейн продемонстрировали возможность использования фрагментов ДНК, полученных после разделения в агарозном геле с низкой температурой плавления без предварительной очистки от агарозы [21] (протокол 13.8).

Протокол 13.7. Получение меченых зондов методом рассеянной затравки

А. Радиоактивное мечение

Материалы

- 10 × буфер для мечения: 500 мМ трис-НСl, pH 8,0, 100 мМ MgCl₂, 1 мМ ДТТ, 2 мг/мл БСА
- Гексануклеотиды: 62,5 ОД₂₆₀/мл
- 10 × dNTP: по 200 мкМ каждого из трифосфатов (dATP, dGTP, dTTP) в ТЭ, pH 8,0
- ТЭ: 10 мМ трис-НСl, pH 8,0, 1 мМ ЭДТА
- [α -³²P]dCTP (удельная радиоактивность > 3000 Ки/ммоль; 110 ТБк/ммоль; 10 мкКи/мкл)
- ДНК-полимераза I (фрагмент Кленова): 2 ЕД/мкл
- Стоп-буфер: 300 мМ ЭДТА, pH 8,0

Протокол 13.7 (Продолжение)

Методика

1. Растворяют ДНК в воде или ТЭ. Двухспочечную ДНК денатурируют прогреванием в течение 5 мин при 95–100 °С и быстро охлаждают во льду.
2. В находящуюся во льду микроцентрифужную пробирку вносят следующие реактивы:

• Денатурированная ДНК	25–250 нг
• 10 × dNTP	2 мкл
• 10 × буфер для мечения	2 мкл
• [α- ³² P]dCTP	5 мкл (50 мкКи; 2 МБк)
• Вода до конечного объема	20 мкл
• Фрагмент Кленова	1 мкл (2 ЕД)

Аккуратно перемешивают медленным пипетированием, собирают содержимое пробирки на дне центрифугированием на микроцентрифуге в течение 2 с.

3. Инкубируют пробирку при температуре 20–37 °С в течение 2–16 ч.
4. Останавливают реакцию, добавив 2 мкл стоп-буфера; невключившиеся нуклеотиды удаляют переосаждением этанолом или хроматографией на сефадексе (см. протокол 13.5).
5. Перед гибридизацией зонд денатурируют, прогревая его раствор в течение 5 мин при 95–100 °С, быстро переносят в лед и выдерживают в течение 5 мин.

Б. Нерadioактивное мечение

Материалы

То же, что и выше, со следующими изменениями:

Для биотина:

- 10 × bio-dNTP: по 1 мМ каждого из трифосфатов (dATP, dGTP, dCTP) и 0,65 мМ dTTP/0,35 мМ bio-7-dUTP при pH 6,5

Для дигоксигенина:

- 10 × dig-dNTP: по 1 мМ каждого из трифосфатов (dATP, dGTP, dCTP) и 0,65 мМ dTTP/0,35 мМ dig-11-dUTP при pH 6

Методика

1. В находящуюся во льду микроцентрифужную пробирку вносят следующие реактивы:

• Свежеденатурированная ДНК	10 нг—3 мкг
• 10 × буфер для мечения	2 мкл
• 10 × dig-dNTP или 10 × bio-dNTP	2 мкл
• Вода до конечного объема	20 мкл
• Фрагмент Кленова	1 мкл (2 ЕД)

Аккуратно перемешивают содержимое пробирки медленным пипетированием и собирают его на дне быстрым (2 с) центрифугированием на микроцентрифуге.

2. Проводят те же операции, что и для получения радиоактивно меченных зондов, начиная с п. 3.

Протокол 13.8. Мечение с использованием фрагментов, полученных с помощью электрофореза в легкоплавком агарозном геле

1. Проводят электрофорез фрагментов ДНК в легкоплавком агарозном геле (трис-ацетатный буфер), содержащем бромистый этидий в концентрации 0,5 мкг/мл (NB! Бромистый этидий — сильный канцероген) (о проведении электрофореза в агарозном геле см. гл. 12). Вырезают кусочек геля с нужным фрагментом (в нем должно содержаться не менее 250 нг ДНК).
2. Переносят его в предварительно взвешенную микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл.
3. Добавляют воду из расчета 3 мл на 1 г агарозного геля и помещают пробирку в кипящую воду на 7 мин для расплавления агарозы и денатурации ДНК.
4. Помещают пробирку не менее чем на 10 мин в водяную баню на 37 °С.
5. В чистую пробирку, содержащую все компоненты для проведения стандартного мечения методом рассеянной затравки, переносят водно-агарозный раствор, содержащий 25 нг ДНК. Если объем этого раствора превышает 10 мкл, то увеличивают объем реакционной смеси до 50 мкл, добавив воду. Во время инкубации возможно образование геля, но реакция удлинения будет идти и в этом случае.

При той концентрации изотопной метки, которая указана в протоколе 13.7, и при уровне включения 65—75% удельная радиоактивность продукта составляет $1,0 \cdot 10^9$ имп./мин на 1 мкг, если используется 25 нг матрицы. В качестве метки можно применять и другие радиоактивно меченные нуклеотиды, но удельная радиоактивность при этом будет значительно ниже. Так, при том же коли-

честве матрицы, но мечении с помощью $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ удельная радиоактивность продукта составит примерно $7,7 \cdot 10^8$ имп./мин на 1 мкг.

По данным электрофореза в щелочных агарозных гелях, полученные методом рассеянной затравки радиоактивно меченные зонды обычно имеют длину 400–600 нуклеотидов. ^{32}P -зонды с высокой удельной радиоактивностью подвергаются быстрому радиолизу, и при хранении в течение даже 24 ч их средний размер значительно уменьшается.

Фрагменты ДНК, полученные при разделении с помощью электрофореза в легкоплавком агарозном геле, можно использовать для синтеза зондов, меченных биотином или дигоксигенином. Эти метки включаются в новосинтезированную ДНК через каждые 20–25 нуклеотидов, так что чувствительность их детекции может быть очень высокой. Размер меченых фрагментов составляет 200–2000 п.н.

4.3. Получение зондов с помощью полимеразной цепной реакции

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) позволяет получать *in vitro* большое число копий специфических фрагментов ДНК, располагая малым количеством сложной и часто загрязненной матрицы [22] (см. гл. 15, 17 и 18). Если в ПЦР-реакции используются меченые трифосфаты, то амплифицированная ДНК (размер которой варьирует от 180 п.н. до 2 т.п.н.) может иметь высокую удельную радиоактивность: $\sim 5 \cdot 10^9$ имп./мин на 1 мкг. Это больше, чем дают методы ник-трансляции и рассеянной затравки. Зонды, получаемые методом ник-трансляции, обычно имеют удельную радиоактивность $0,5 \cdot 10^9$ имп./мин на 1 мкг, но эффективность мечения снижается, если размер используемых фрагментов ДНК становится меньше 1 т.п.н. Для метода рассеянной затравки удельная радиоактивность зонда составляет $2 \cdot 10^9$ имп./мин на 1 мкг, но и в этом случае эффективность мечения снижается для фрагментов, размер которых находится вне диапазона 0,5–2 т.п.н. Таким образом, метод ПЦР оказывается особенно ценным, когда требуется получить зонды с высокой удельной радиоактивностью, располагая субнанограммовыми количествами ДНК-матрицы размером менее 500 п.н. При необходимости путем частичной замены меченых нуклеотидов «холодными» (немечеными) трифосфатами методом ПЦР можно получить зонды и с более низкой удельной радиоактивностью. Для получения полноразмерной

копии ДНК-матрицы все четыре нуклеотида должны присутствовать в реакционной смеси в эквимоллярных количествах.

Обычно используемые для ПЦР-мечения матрицы уже были переклонированы в каком-либо векторе. Это позволяет с помощью ограниченного числа праймеров, комплементарных участкам, соседствующим с сайтом инсерции ДНК-матрицы в векторе, получить большое число зондов, комплементарных различным клонированным фрагментам ДНК. Недавно метод ПЦР использовали и для получения меченых зондов путем непосредственной амплификации геномной ДНК [24].

К 5'-концу олигонуклеотидного праймера можно присоединить последовательность, не комплементарную матрице. При ПЦР эта последовательность будет встроена в двухцепочечный продукт, и если она представляет собой промотор, узнаваемый РНК-полимеразой, то амплифицированный фрагмент можно будет транскрибировать с использованием ДНК-зависимой РНК-полимеразы (см. разд. 5). Это позволяет получить меченый РНК-транскрипт без переклонирования фрагмента ДНК под контроль фагового промотора [24].

4.3.1. Температура

В ходе ПЦР образцы инкубируют при трех разных температурах, соответствующих трем этапам амплификационного цикла: денатурации (90–95 °С), отжигу (40–60 °С) и удлинению праймера (72 °С). Используемое для смены температур оборудование может быть как очень простым (водяные бани с разной температурой при неавтоматизированном режиме), так и весьма сложным (блоки для нагревания с быстрой сменой температуры, контролируемой с помощью микропроцессора, при автоматизированной амплификации; их производят фирмы Perkin—Elmer Cetus Instruments, Techne, Koch-Light и другие).

Процедура получения меченых зондов с помощью ПЦР описана в протоколе 13.9. Частой причиной неудач бывает недостаточное прогревание реакционной смеси на этапе денатурации. Для успешной денатурации смесь должна быть нагрета до примерно 93 °С и затем быстро охлаждена до температуры отжига. Чтобы уменьшить испарение, на реакционную смесь наслаивают 50 мкл минерального масла.

Температура отжига зависит от длины праймера и его GC-содержания. Ее можно рассчитать по формуле

$$4^{\circ}\text{C} \times [\text{G} + \text{C}] + 2^{\circ}\text{C} \times [\text{A} + \text{T}] - 3.$$

Однако на практике для каждого набора олигонуклеотидных праймеров (обычно длиной примерно 20 п.н.) эта температура подбирается экспериментально. Поскольку праймеры присутствуют в реакционной смеси в большом избытке, их отжиг происходит практически мгновенно, так что время отжига может быть очень небольшим.

Удлинение праймера при 72 °С происходит в условиях, близких к температурному оптимуму для ДНК-полимеразы *Taq*. Время инкубации при этой температуре зависит от длины амплифицируемого фрагмента ДНК: копирование каждых 1000 п.н. занимает ~ 1 мин. Если длина фрагмента менее 150 п.н., то этап удлинения праймера можно вообще опустить, поскольку для полного удлинения отожженного праймера в этом случае вполне достаточно нескольких секунд, которые образец находится при 70–75 °С во время перехода от температуры отжига к температуре денатурации.

Описаны также эффективный метод получения с помощью ПЦР зондов, меченных дигексогенином, и простой метод очистки неизотопно меченных фрагментов с помощью электрофореза в легкоплавком агарозном геле [25].

4.3.2. Меры предосторожности

При полимеразной цепной реакции может происходить амплификация всего одной молекулы ДНК, поэтому необходимо исключить загрязнение реактивов следовыми количествами посторонней ДНК, которая могла бы служить матрицей (меры предосторожности подробно рассмотрены в гл. 15 и 17).

Протокол 13.9. Получение меченых зондов с помощью ПЦР

А. Радиоактивное мечение

Материалы

- 20 × реакционный буфер (20 × РБ): 1 М КСl, 200 мМ трис-НСl, рН 8,3, 30 мМ MgCl₂, 0,2% (в/о) желатина, по 4 мМ dATP, dTTP, dGTP
- ДНК-матрица
- Смесь праймеров: по 20 мкМ каждого из 5'- и 3'-праймеров
- [α -³²P]dCTP (удельная радиоактивность >3000 Ки/ммоль; 110 ТБк/ммоль; 10 мкКи/мкл)
- ДНК-полимераза *Taq*: 2 ЕД/мкл
- Минеральное масло
- Стоп-буфер: 300 мМ ЭДТА, рН 8,0

Методика

1. В микроцентрифужную пробирку на 500 мкл вносят при комнатной температуре в указанном порядке следующие реактивы:

• 20 × РБ	1 мкл
• Вода	1 мкл
• Смесь праймеров	2 мкл
• [α - 32 P]dCTP	15 мкл (150 мкКи)
• ДНК-матрица	1 мкл (2 нг)

2. Инкубируют смесь при 93 °С 10 мин и добавляют

ДНК-полимеразу <i>Taq</i>	0,5 мкл (1 ЕД)
---------------------------	----------------

3. Проводят 30–35 циклов ПЦР при эмпирически подобранных для данных праймеров температурах отжига, удлинения и денатурации, например:

Отжиг	1 мин при 50 °С
Удлинение	2 мин при 72 °С
Денатурация	1 мин при 93 °С

4. Инкубируют 10 мин при 72 °С, чтобы обеспечить полное удлинение.

5. Останавливают реакцию, добавив 2 мкл стоп-буфера. Очищают зонд от невключившихся нуклеотидов переосаждением этанолом или хроматографией на сефадексе (см. протокол 13.5).

6. Перед гибридизацией денатурируют меченую ДНК прогреванием в течение 5 мин при 95–100 °С с последующим резким охлаждением во льду в течение 5 мин.

Б. Нерadioактивное мечение

Материалы

Все, как описано выше для радиоактивного мечения, со следующими изменениями:

Для биотина:

- 20 × РБ: 1 М KCl, 200 мМ трис-HCl, pH 8,3, 30 мМ MgCl₂, 0,2% (в/о) желатина, по 4 мМ dATP, dCTP, dGTP, 2,6 мМ dTTP, 1,4 мМ bio-11-dUTP

Для дигоксигенина:

- 20 × РБ: 1 М KCl, 200 мМ трис-HCl, pH 8,3, 30 мМ MgCl₂, 0,2% (в/о) желатина, по 4 мМ dATP, dCTP, dGTP, 2,6 мМ dTTP, 1,4 мМ dig-11-dUTP

Протокол 13.9 (Продолжение)

Методика

1. В микроцентрифужную пробирку на 500 мкл вносят в указанном порядке следующие реактивы:

• 20 × РБ (с dig-11-dUTP или bio-11-dUTP)	1 мкл
• Смесь праймеров	2 мкл
• ДНК-матрица	1 мкл (2 нг)
• Вода	16 мкл

2. Далее — как для радиоактивного мечения, начиная с п. 2. Эффективность включения метки определяют, как описано в разд. 3.3.

5. Синтез РНК-зондов методом транскрипции *in vitro*

5.1. Кодированные бактериофагами ДНК-зависимые РНК-полимеразы

РНК-полимеразы катализируют полимеризацию рибонуклеозидтрифосфатов (rNTP) с образованием РНК, используя в качестве матрицы ДНК. РНК-полимеразы, кодируемые бактериофагами *E. coli* (такими, как T7, T3, SP6), могут распознавать только фаговые промоторы [26], но не бактериальные, плазмидные или эукариотические, которые могут присутствовать в клонированных последовательностях ДНК. Поэтому их можно использовать для синтеза специфичных одноцепочечных молекул РНК *in vitro* [27].

5.2. Выбор вектора

Чтобы осуществить транскрипцию специфической ДНК-матрицы, ее нужно встроить в специальный вектор с 3'-стороны от подходящего фагового промотора (рис. 13.4). Необходимость в особом клонировании привела к созданию векторов, в которых фаговый промотор находится с 5'-стороны от множественного сайта клонирования, например pSP70 [4], pBluescribe и pBluescript (Stratagene), pGEM (Promega, Madison). Выбор вектора в основном определяется личными предпочтениями исследователя. Если необходимо получить транскрипты обеих цепей матрицы (т. е. синтезировать и смысловую, и антисмысловую РНК), то целесообразно выбрать вектор с двумя разными фаговыми промоторами, а не встраивать ДНК-матрицу в разных ориентациях в плазмиду с одним промотором. Это имеет большое значение при получении

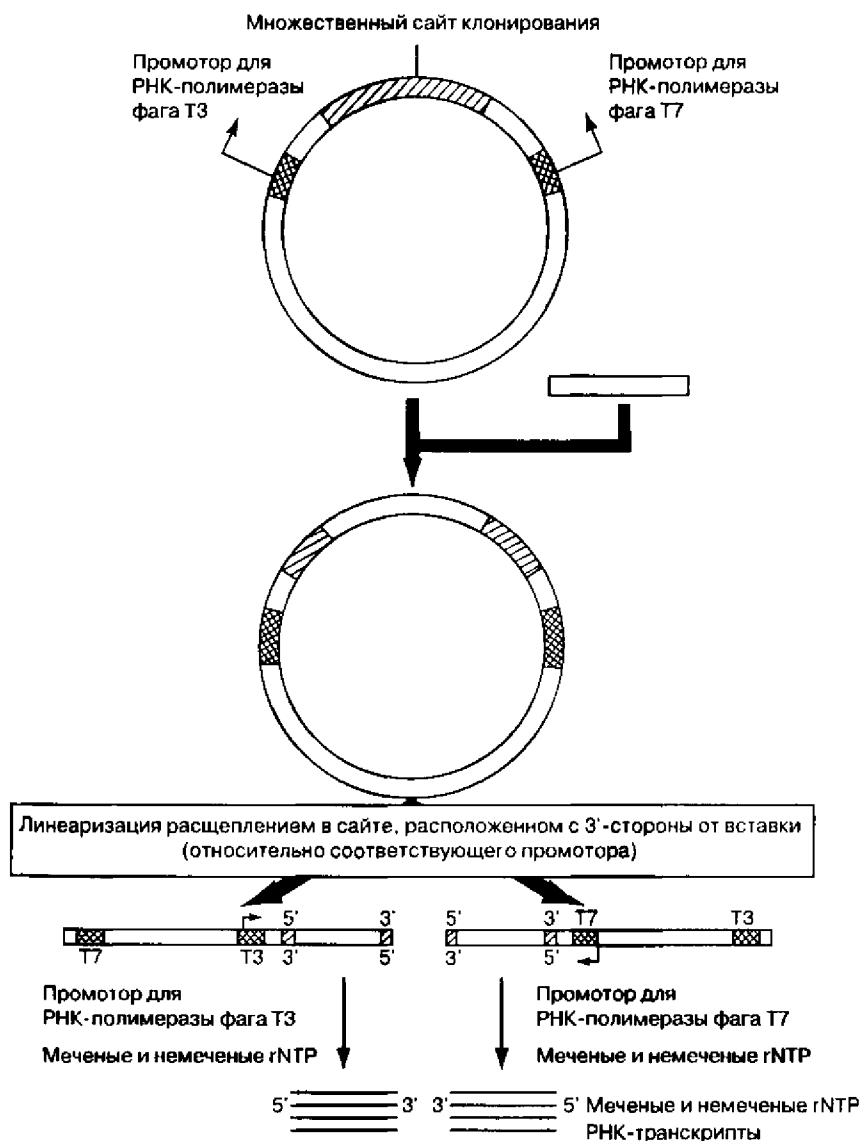


Рис. 13.4. Получение РНК-зондов с использованием плазмиды, содержащей промоторы для РНК-полимераз фагов Т3 и Т7.

зондов для гибридизации *in situ*, поскольку смысловая РНК используется при локализации специфических мРНК в качестве отрицательного контроля.

Важно определить положение сайтов рестрикции как в самой ДНК-матрице, так и с 3'-стороны от нее. Если 5'-конец транскрипта задается фаговым промотором, то его второй конец определяется выбранным для расщепления эндонуклеазой сайтом в 3'-половине ДНК-вставки. Лучше использовать рестриктирующие эндонуклеазы, дающие тупые или 5'-выступающие липкие концы, поскольку РНК-полимеразы способны осуществлять обратную транскрипцию с 3'-выступающих липких концов с образованием транскриптов, комплементарных зонду, который намереваются получить [28].

5.3. Получение ДНК-матрицы

Работая с препаратами РНК, необходимо принять все меры для предотвращения загрязнения используемых растворов РНК-азами. Все операции следует проводить в перчатках, а растворы обрабатывать ДЭПК. Для этого в растворы добавляют ДЭПК до 0,1% (о/о), выдерживают их в течение 1 ч и автоклавируют для разложения ДЭПК. Такой способ непригоден для буферов, содержащих трис. Эти буферы готовят на обработанной ДЭПК воде и автоклавируют. Плазмидную ДНК для дальнейшей транскрипции лучше всего получать центрифугированием в градиенте плотности (протокол 13.3). Однако можно использовать и плазмиды, выделенные с помощью одного из микрометодов.

Очень важно, чтобы ДНК-матрица была в нужной степени рестрицирована: сверхспиральная ДНК является высокоэффективной матрицей для всех фаговых РНК-полимераз, что приводит к образованию очень длинных транскриптов.

После эндонуклеазной обработки ДНК очищают экстракцией фенолом и хлороформом с последующим переосаждением этанолом (протокол 13.10).

Протокол 13.10. Общий метод очистки нуклеиновых кислот от белков

1. Экстракция фенолом

Добавляют к раствору ДНК или РНК равный объем фенола, насыщенного ТЭ¹⁾ (гл. 12), перемешивают переворачиванием до образования гомогенной смеси и разделяют фазы центрифугированием на микроцентрифуге при 12 000 *g* в течение 10 мин. Осторожно отбирают пипеткой верхнюю (водную) фазу и переносят ее в чистую пробирку.

2. Экстракция фенолом : хлороформом

К полученной на этапе 1 водной фазе добавляют равный объем смеси фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (25 : 24 : 1, о/о). Для этого сначала готовят раствор хлороформ:изоамиловый спирт (24 : 1, о/о), а затем добавляют его в соотношении 1 : 1 к насыщенному буфером фенолу. Перемешивают фазы и разделяют их, как это описано в п. 1.

3. Экстракция хлороформом

Полученную на этапе 2 водную фазу экстрагируют равным объемом смеси хлороформ : изоамиловый спирт (24 : 1) и разделяют фазы, как это описано в п. 1.

4. Переосаждение этанолом

Добавляют 1/10 объема 3 М ацетата натрия, pH 4,5, и два объема этанола к полученной на этапе 3 водной фазе, перемешивают и охлаждают при -70°C или в сухом льду.

Собирают нуклеиновые кислоты центрифугированием на микроцентрифуге при 12 000 g в течение 10 мин. Осторожно отбирают супернатант, промывают осадок 70% этанолом при комнатной температуре и повторяют центрифугирование, как описано выше. Максимально полно отбирают супернатант, осадок подсушивают на воздухе и растворяют в необходимом количестве буфера ТЭ.

¹⁾ ТЭ: 10 mM трис-HCl, pH 7,5, 1 mM ЭДТА.

5.4. Транскрипция

Метод транскрипции *in vitro* для получения полноразмерных [α - ^{32}P]UTP-РНК-зондов с высокой удельной радиоактивностью описан в протоколе 13.11 [27]. Там же приведены методы нерадиоактивного мечения с помощью биотина и дигоксигенина.

Протокол 13.11. Получение РНК-зондов

А. Радиоактивное мечение

Материалы

- 10 × транскрипционный буфер (10 × ТБ): 400 mM трис-HCl, pH 7,5, 60 mM MgCl_2 , 10 mM спермидин
- 10 × rNTP: по 5 mM rATP, rCTP, rGTP, pH 7,5, 250 мкМ rUTP, pH 7,5
- [α - ^{32}P]UTP (удельная радиоактивность 400–3000 Ки/ммоль)

Протокол 13.11 (Продолжение)

- 100 мМ ДТТ
- Плацентарный ингибитор рибонуклеаз (РНКазин): 40 ЕД/мкл
- Полимеразы фагов SP6, T7 или T3: 10–20 ЕД/мкл
- ДНК-матрица, линейаризованная разрезанием с 3'-стороны от фагового промотора (0,1–1,0 мкг)

Методика

1. В микроцентрифужную пробирку вносят в указанном порядке следующие реактивы:

- | | |
|-------------------------|-------------------------------|
| • 10 × ТБ | 5 мкл |
| • 100 мМ ДТТ | 5 мкл |
| • РНКазин | 1,5 мкл (примерно 80 ЕД) |
| • 10 × rNTP | 5 мкл |
| • Вода | 26,5 мкл |
| • ДНК-матрица | 1 мкл (примерно 0,1–1,0 мкг) |
| • [³² P]UTP | 5 мкл (эквивалентно 12,5 мкМ) |
| • РНК-полимераза | 1 мкл (10–20 ЕД) |

2. Инкубируют смесь при 37 °С в течение 1 ч (в случае РНК-полимераз Т3 и Т7) и в течение 2 ч (в случае РНК-полимеразы SP6).

3. Необязательный этап: разрушают ДНК-матрицу, обработав ее в течение 15 мин при 37 °С свободной от РНКаза ДНКазой (1 ЕД), и очищают зонд, как это описано в протоколе 13.10, добавив равный объем смеси фенол : хлороформ (1 : 1, о/о). Невключившиеся меченые нуклеотиды удаляют хроматографией на сефадексе (протокол 13.5).

4. Переосаждают РНК, как это описано в протоколе 13.5, и растворяют ее в 100 мкл обработанной ДЭПК воды.

Б. Нерadioактивное мечение

Материалы

Те же, что и выше, со следующими изменениями:

- 10 × ТБ: 400 мМ трис-НCl, pH 7,5, 60 мМ MgCl₂, 20 мМ спермидин, 100 мМ ДТТ, 100 мМ NaCl
- 10 × dig-rNTP: по 10 мМ rATP, rCTP, rGTP, 6,5 мМ rUTP/3,5 мМ dig-UTP, pH 7,5
или
- 10 × bio-rNTP: по 10 мМ rATP, rCTP, rGTP, 6,5 мМ rUTP/3,5 мМ bio-UTP, pH 7,5

Методика

1. В микроцентрифужную пробирку, помещенную в лед, вносят следующие реактивы:

• 10 × ТБ	2 мкл
• Вода	12 мкл
• РНКазин	1 мкл
• Линеаризованная ДНК-матрица	1 мкл (1 мкг)
• 10 × dig-rNTP или 10 × bio-rNTP	2 мкл
• РНК-полимераза	2 мкл (40 ЕД)

2. Инкубируют смесь при 37 °С в течение 1 ч (в случае РНК-полимераз Т3 и Т7) и в течение 2 ч (в случае РНК-полимеразы SP6).
3. Останавливают реакцию, добавив 0,2 М ЭДТА, рН 8,0, и пересаживают РНК этанолом, как описано в протоколе 13.5 (но вместо ацетата калия используют хлористый литий). Растворяют РНК в 100 мкл обработанной ДЭПК воды. Эффективность включения метки определяют, как это описано в разд. 3.3.

К протоколу 13.11 необходимо сделать следующие замечания.

- а. ДНК-матрицу необходимо добавлять только после разбавления 10 × ТБ, содержащего спермидин в концентрации 20 мМ. При концентрации спермидина > 4 мМ ДНК может выпасть в осадок.
- б. Скорость включения в РНК bio-UTP с помощью РНК-полимеразы SP6 очень мала, поэтому следует использовать РНК-полимеразы Т3 и Т7.
- в. Эффективность фенольной очистки меченной дигоксигенином РНК очень мала вследствие частичного перехода меченой РНК в органическую фазу, так что этот этап следует опустить [18].

Если для гибридизации *in situ* или на фильтрах необходимы зонды с очень высокой удельной радиоактивностью и если при этом образование полноразмерных РНК-транскриптов не является абсолютно необходимым, то можно полностью исключить из реакции «холодный» гUTP и уменьшить объем реакционной смеси до 10 мкл. Максимальной удельной радиоактивности зонда можно достичь, если проводить мечение в объеме 20 мкл и использовать 100 мкКи UTP с удельной радиоактивностью 400 Ки/ммоль. Конечная концентрация UTP в реакционной смеси составляет при этом 12,5 мкМ [27].

В тех случаях, когда после гибридизации *in situ* необходимо определить клеточную локализацию сигнала, лучше использовать в качестве метки изотоп ^{35}S , позволяющий получить более высокое разрешение, чем ^{32}P .

Для выявления мРНК в архивных биоптатах с успехом использовались нерадиоактивно меченные РНК-зонды (J. C. Martinez-Montero, в печати). Эти зонды можно хранить при -20°C , не опасаясь деградации РНК, более двух лет, что значительно превышает время полудегradации зондов, меченных ^{32}P и ^{35}S .

5.5. Преимущества РНК-зондов и возможности их применения

РНК-зонды имеют ряд преимуществ по сравнению с двухцепочечными ДНК-зондами, полученными методами ник-трансляции или рассеянной заправки. К таким преимуществам относятся высокая удельная радиоактивность ($1 \cdot 10^9$ имп./мин на 1 мкг), отсутствие гибридизации между самими зондами, точно известный размер. Эти зонды можно использовать в тех же случаях, что и ДНК-зонды, причем более высокая термостабильность гибридов РНК—РНК по сравнению с гибридами РНК—ДНК повышает чувствительность метода, а возможность расщепить непрогибризовавшуюся (одноцепочечную) РНК РНКазой А позволяет существенно снизить фон [29] и получить высокое отношение сигнал/шум [30].

РНК-зонды используются и в более специальных экспериментах: при РНКазном картировании (определении положения концов молекулы-мишени) [31], в опытах по трансляции *in vitro* [32], для специфического блокирования экспрессии генов антисмысловыми РНК [33].

6. Получение олигонуклеотидных зондов

6.1. Типы олигонуклеотидных зондов и их применение

Синтез коротких одноцепочечных фрагментов ДНК (олигонуклеотидов) химическими методами с помощью автоматических синтезаторов является сейчас рутинной процедурой [34]. Простота получения олигонуклеотидов с определенной последовательностью позволяет использовать их в различных целях: в качестве праймеров при секвенировании ДНК, как зонды для выявления методом гибридизации по Саузерну специфических групп генов,

отдельных генов и даже точковых мутаций в определенных аллелях [36–37] (гл. 21).

Чаще всего применяют три типа олигонуклеотидных зондов: олигонуклеотиды с четко определенной последовательностью, пулы коротких олигонуклеотидов с сильно «вырожденными» последовательностями и пулы более длинных олигонуклеотидов с менее «вырожденными» последовательностями.

Олигонуклеотиды со строго заданной последовательностью синтезируют как фрагмент последовательности клонированного участка ДНК, и такие олигонуклеотиды полностью комплементарны последовательности мишени. Обычно их длина составляет от 19 до 40 нуклеотидов, и при гибридизации в правильно подобранных условиях они могут отличать последовательность-мишень от других, близкородственных ей последовательностей. Такие олигонуклеотиды используются для скрининга библиотек кДНК и геномных ДНК с целью выявления клонов, содержащих фрагменты ДНК, перекрывающиеся с ранее клонированными последовательностями.

Нуклеотидные последовательности коротких вырожденных олигонуклеотидов можно найти, определив аминокислотные последовательности коротких полипептидов секвенированием микроколичеств (пикомоли) высокоочищенных белков [38]. Вследствие вырожденности генетического кода обычно приходится синтезировать несколько олигонуклеотидов, соответствующих всем возможным вариантам кодирования данной аминокислотной последовательности. Пул таких вырожденных олигонуклеотидов можно использовать в качестве набора гибридизационных зондов для получения клонов-кандидатов, из которых потом можно отобрать клон, несущий тот ген, который нас интересует. Этот подход с успехом использовался для получения как кДНК [39], так и геномных клонов [40]. Размер вырожденных олигонуклеотидов в таком пуле составляет 17–20 нуклеотидов, так что они являются достаточно длинными для обеспечения специфической гибридизации с искомым геном и в то же время слишком короткими для образования неправильных гибридов с негомологичными последовательностями, которые детектировались бы гибридизационными методами.

Длинные (30–70 звеньев) олигонуклеотиды с меньшей степенью вырожденности тоже находят достаточно широкое применение, поскольку эффект неправильного спаривания с избытком компенсируется теми преимуществами, которые дает образование длинных стабильных гибридов.

6.2. Мечение 5'-концов

На 5'-конце синтезированных олигонуклеотидов отсутствует фосфатная группа, поэтому обычно их метят с помощью $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ фосфорилированием 5'-конца при участии полинуклеотидкиназы фага T4 (протокол 13.12 и рис. 13.5). В результате у олигонуклеотида оказывается помечен всего один нуклеотид [41], и удельная радиоактивность зонда оказывается существенно ниже, чем при мечении методами ник-трансляции, рассеянной затравки, ПЦР и транскрипции *in vitro*. Само собой разумеется, что удельная радиоактивность олиго-зонда не может быть выше, чем у меченого нуклеотида, поэтому для концевоего мечения обычно используют ^{32}P -нуклеотиды.

Очень важно хорошо очистить меченые олигонуклеотиды от невключившегося $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ и быть уверенным в том, что гибридизации зонда с мишенью не мешают примеси немеченых олигонуклеотидов. Для очистки можно провести тонкослойную хроматографию или электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии 7 М мочевины [42].

Для получения олигонуклеотидов с 5'-концом, помеченным нерадиоактивной меткой, к 5'-концу присоединяют аминогруппу, с которой затем в ходе химической (а не ферментативной) реакции легко связывается биотин. Этот метод описан в работе [43].

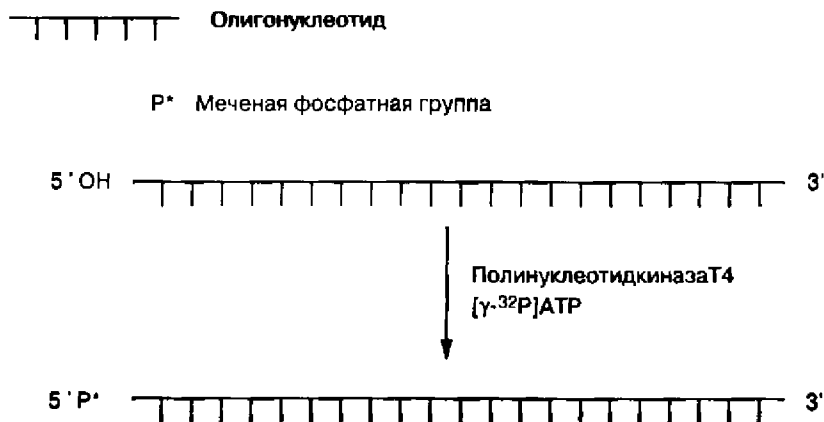


Рис. 13.5. 5'-концевое мечение олигонуклеотида с помощью полинуклеотидкиназы T4.

Протокол 13.12. Мечение 5'-концов при участии полинуклеотидкиназы фага T4

Материалы

- Олигонуклеотид (примерно 0,1 мкг, если длина олигонуклеотида — 19 звеньев)
- 10 × киназный буфер (10 × КБ): 500 мМ трис-НСl, рН 7,6, 100 мМ MgCl₂, 50 мМ ДТТ, 1 мМ спермидин
- Полинуклеотидкиназа T4: 4 ЕД/мкл
- [γ -³²P]АТР (удельная радиоактивность 3000 Ки/ммоль; 110 ТБк/ммоль; 10 мкКи/мкл)

Методика

1. В помещенную в лед микроцентрифужную пробирку на 0,5 мл вносят реактивы в следующем порядке:
 - Олигонуклеотид 1 мкл (15 пмолей 5'-концов)
 - Вода до конечного объема 10 мкл
 - 10 × КБ 1 мкл
 - [γ -³²P]АТР¹⁾ 1 мкл (примерно 150 мкКи)
 - Полинуклеотидкиназа T4 1 мкл (4 ЕД)

Осторожно перемешивают реакционную смесь медленным пипетированием. Центрифугируют при 12 000 g в течение 2 с в микроцентрифуге.

2. Выдерживают при 37 °С в течение 45 мин.

3. Невключившиеся нуклеотиды удаляют с помощью фильтрации на сефадексе G-50, гель-электрофореза, ЖХВР или ТСХ [42].

¹⁾ Меченый нуклеотид необходимо высушить и вновь растворить в 1 или 2 мкл воды с тем, чтобы провести реакцию в минимальном объеме для последующей очистки олиго-зонда с помощью гель-электрофореза.

Для 5'-концевого мечения может использоваться также [γ -³²S]АТР, но для достижения высокой скорости реакции необходима более высокая концентрация киназы. ³⁵S-олиго-зонды можно использовать для гибридизации *in situ*.

6.3. Мечение 3'-концов

Для получения 3'-меченых олигонуклеотидных зондов можно использовать терминальную дезоксинуклеотидилтрансферазу (TdT) и ³²P-, ³⁵S- или ³H-нуклеотиды либо нерадиоактивные метки (биотин или дигоксигенин). Присоединение к 3'-концу олиго-

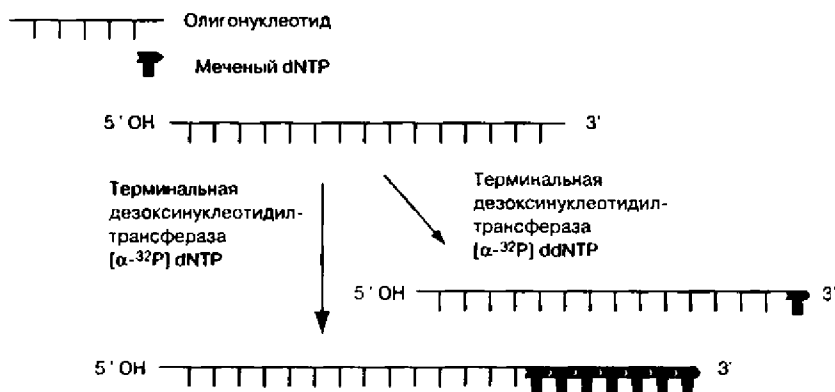


Рис. 13.6. 3'-концевое мечение олигонуклеотида с помощью терминальной дезоксирибонуклеотидилтрансферазы.

нуклеотида одного или нескольких нуклеотидов [44], катализируемое TdT, происходит в присутствии двухвалентных катионов и ингибируется хелатирующими агентами типа ЭДТА. В присутствии Mg^{2+} фермент катализирует присоединение только одного или двух нуклеотидных остатков, а при замене ионов магния на ионы кобальта эффективность реакции и число присоединяемых нуклеотидных остатков повышаются.

Если ставится задача присоединить к 3'-концу только один меченый нуклеотид, то используется дидезоксирибонуклеозид-5'-трифосфат (обычно $[\alpha\text{-}^{32}P]\text{ddATP}$) (рис. 13.6). Он не содержит 3'-гидроксильной группы, так что после присоединения первого остатка полимеризация сразу останавливается [45]. Вскоре в продаже появится реактив dig-11-ddUTP фирмы Boehringer Mannheim, что позволит включать в олигонуклеотиды один 3'-концевой нерадиоактивно меченный остаток.

При включении нескольких нуклеотидов метку надо вводить в α -положение фосфатной группы или во внутренний остаток основания. Зонды не должны содержать на конце dTTP, поскольку этот «хвост» может гибридизоваться с $\text{poly(A)}'$ -участком мРНК, что приведет к повышению фона. Аналогичным образом, зонды, содержащие на конце $[\alpha\text{-}^{32}P]\text{dATP}$, могут гибридизоваться с poly(T) -участками в геномной ДНК человека. Длина меченого «хвоста» (и удельная радиоактивность полученного зонда) определяется относительной молярной концентрацией 3'-концов и dNTP. В условиях, описанных в протоколе 13.13, в состав хвоста

(длиной примерно 100 нуклеотидов) включается около 60% меченого предшественника $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$. Эффективность включения $[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dCTP}$ несколько ниже, и в этом случае необходимо использовать большие концентрации фермента и увеличивать время реакции.

Протокол 13.13. 3'-концевое мечение с использованием терминальной дезоксиинуклеотидилтрансферазы

А. Радиоактивное мечение

Материалы

- $5 \times \text{TdT}$ -буфер: 5 мМ CoCl_2 , 500 мМ какодилат натрия, pH 7,0, 1 мМ ДТТ
- $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ (удельная радиоактивность 5000 Ки/ммоль; 185 ТБк/ммоль)
- Олигонуклеотид: 20 нг/мкл (для олигонуклеотида из 20 звеньев это соответствует 3 пмолям 3'-концов)
- Терминальная дезоксиинуклеотидилтрансфераза: 5 ЕД/мкл
NB! Какодилат — это ядовитое вещество, содержащее мышьяк. Необходимо избегать его попадания на кожу.

Методика

1. В помещенную в лед микроцентрифужную пробирку вносят следующие реактивы:

• $5 \times \text{TdT}$ -буфер	10 мкл
• Олигонуклеотид	1 мкл (3 пмоля 3'-концов)
• Вода	18 мкл
• $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$	20 мкл (200 мкКи)
• TdT	1 мкл (5 ЕД)
2. Содержимое пробирки перемешивают и быстро центрифугируют в микроцентрифуге при 12 000 g. Инкубируют при 37 °C в течение 45–60 мин.
3. Останавливают реакцию прогреванием в течение 5 мин при 65 °C. Реакционную смесь охлаждают во льду.
4. Невключившиеся нуклеотиды удаляют с помощью гель-электрофореза, ЖХВР или ТСХ [42].

Б. Нерadioактивное мечение

Материалы

Те же, что и выше, со следующими изменениями:

Протокол 13.13 (Продолжение)

Для биотина:

- 5 × TdT-буфер: 5 мМ CoCl₂, 700 мМ какодилат натрия, 0,5 мМ ДТТ, 150 мМ трис-НСl, рН 6,8
- Bio-11-dUTP: 0,4 ммоль
- Олигонуклеотид (до 1 мкг, что для олигонуклеотида из 20 звеньев соответствует примерно 150 пмолям 3'-концов)
- TdT: 50 ЕД/мкл

Методика

1. В помещенную в лед микроцентрифужную пробирку вносят следующие реактивы:

• 5 × TdT-буфер	10 мкл
• Олигонуклеотид	10 мкл (150 пмолей)
• Bio-11-dUTP	1,75 мкл
• TdT	1 мкл (50 ЕД)
• Вода	27,25 мкл
2. Перемешивают реактивы и быстро центрифугируют в микроцентрифуге при 12 000 g. Инкубируют при 37 °С в течение 2 ч.
3. Доводят объем раствора с зондом до 100 мкл и очищают зонд центрифугированием на колонке, как это описано в протоколе 13.5. Меченый зонд содержит на 3'-конце до трех остатков биотина. Хранят зонд при -20 °С.

Для дигоксигенина:

Материалы

Те же, что и выше, со следующими изменениями:

- 5 × TdT-буфер: 1 М какодилат калия, 125 мМ трис-НСl, рН 6,6, бычий сывороточный альбумин, 1,25 мг/мл
- CoCl₂: 5 мМ
- dATP: 2,5 мМ
- dig-11-dUTP: 1 мМ
- Олигонуклеотид (до 1 мкг, что для олигонуклеотида из 20 звеньев соответствует примерно 150 пмолям 3'-концов).
- TdT: 55 ЕД/мкл

Методика

1. В помещенную в лед микроцентрифужную пробирку вносят следующие реактивы:

• 5 × TdT-буфер	10 мкл
• CoCl ₂	20 мкл
• dATP	3,5 мкл
• Олигонуклеотид	10 мкл (100 пмолей)
• dig-11-dUTP	1 мкл
• TdT	1 мкл (50 ЕД)
• Вода	4,5 мкл

2. Перемешивают реактивы и быстро центрифугируют в микроцентрифуге при 12 000 g. Инкубируют при 37 °С в течение 15 мин.
3. Доводят объем раствора с зондом до 100 мкл и очищают зонд центрифугированием на колонке, как это описано в протоколе 13.5. Олиго-зонд содержит «хвост» из меченых и немеченых нуклеотидов. Хранят зонд при -20 °С.

Описанный в протоколе 13.13 метод обычно используют для мечения коротких (длиной 20–30 звеньев) олигонуклеотидов. Клонированные в векторе M13 более длинные олигонуклеотиды (≥ 70 звеньев) метят с помощью удлинения «универсального» праймера [46]. Альтернативный метод получения длинных зондов основан на отжиге двух разных олигонуклеотидов, содержащих на 3'-концах комплементарные последовательности. Вторую цепь, комплементарную выступающим одноцепочечным участкам, достраивают с помощью фрагмента Кленова в присутствии меченых нуклеотидов. Метод удлинения праймера описан в предыдущих главах и работе [42].

Обычно олиго-зонды содержат только один меченый нуклеотид, поэтому их удельная радиоактивность значительно ниже (примерно $5 \cdot 10^6$ имп./мин на 1 мкг), чем у равномерно меченных зондов. Чтобы повысить чувствительность метода гибридизации, можно использовать «коктейль» из нескольких олигонуклеотидов, комплементарных разным участкам нуклеиновой кислоты-мишени.

7. Заключение

Надежность и простота работы с плазмидами сделала их наиболее распространенным вектором для молекулярного клонирования. Интересующие исследователя фрагменты ДНК, переклонированные в плазмидах, необходимо ввести в бактериальную клетку-хозяина с помощью трансформации. Нами описан простой и эффективный метод введения сверхспиральной плазмидной ДНК в бактериальную клетку.

Для очистки рекомбинантных бактериальных плазмид разработаны различные методы, но чаще всего для аналитических и препаративных целей применяется подход, предложенный в работе [10] и описанный в разд. 2.

Мы также суммировали данные о радиоактивных и нерадиоактивных метках, которые можно использовать при работе с нуклеиновыми кислотами, и описали ряд ферментативных методов, пригодных для их включения.

В целом нерадиоактивно меченные зонды позволяют получить такую же чувствительность, что и зонды, меченные ^{32}P , при удельной радиоактивности последних $1-5 \cdot 10^8$ имп./мин на 1 мкг. Для получения меченых зондов в большинстве случаев можно использовать ник-трансляцию, ПЦР, метод рассеянной затравки, метод с использованием фаговых полимераз. Впрочем, иногда, например при гибридизации с мРНК, оптимальными являются РНК-зонды или «коктейль» из меченых олигонуклеотидов.

Благодарности

Я хотела бы выразить свою признательность Lisa Ramshaw, John Loughlin, Mark Evans за критические замечания, высказанные ими по прочтении рукописи этой главы, а также Sean McCarthy за подготовку рисунков. Работа финансировалась Cancer Research Campaign, UK.

Литература

1. Kohen S. N., Chang A. C. Y., Hsu L. (1972). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **69**, 2110.
2. Yanisch-Perron C., Vieira J., Messing J. (1985). *Gene*, **33**, 103.
3. Ullman A., Jacob F., Monod J. (1967) *J. Mol. Biol.*, **24**, 339.
4. Krieg P. A., Melton D. A. (1987) *Methods in enzymology*, Vol. 155 (ed. R. Wu), p. 397. Academic Press, Orlando, Florida.
5. Weinstock G. M., Rhys C., Berman M. L., Hamper B., Jackson D., Silhavy et al. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 4432.
6. Mandel M., Higa A. (1970) *J. Mol. Biol.*, **53**, 159.
7. Hanahan D. (1983). *J. Mol. Biol.*, **166**, 557.
8. Clewell D. B. (1972) *J. Bacteriol.*, **11**, 667.
9. Hardy K. G. (ed.) (1987) *Plasmids: A practical approach*. IRL Press, Oxford.
10. Birnboim H. C., Doly J. (1979). *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1513.
11. Canter C. R., Schimmel P. R. (1980). In: *Biophysical Chemistry, Part III*, p. 1251, W.H. Freeman, San Francisco.
12. Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J. (ed.) (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual* (2nd edn). Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
13. Polak, J. M., McGee J. O'D. (ed.) (1990). In situ hybridisation, principles and practice: A practical approach. IRL Press, Oxford.

14. Chan V. T. W., Fleming K. A., McGee J. O'D. (1985). *Nucleic Acids Res.*, **13**, 8083.
15. Forster A. C., McInnes J. L., Skingle D. C., Symons R. H. (1985) *Nucleic Acids Res.*, **13**, 745.
16. Reisfeld A., Rothenberg J. M., Bayer E. A., Wilchek M. (1987). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 519.
17. Viscidi R. P., Connelly C. J., Yolken R. H. (1986). *J. Clin. Microbiol.*, **23**, 311.
18. Holtk H. J., Kessler C. (1990). *Nucl. Acids Res.*, **18**, 5843.
19. Rigby P. W. J., Dieckmann M., Rhodes C., Berg P. (1977). *J. Mol. Biol.*, **113**, 237.
20. Feinberg A. P., Vogelstein B. (1983). *Analyt. Biochem.*, **132**, 6.
21. Feinberg A. P., Vogelstein B. (1984). *Analyt. Biochem.*, **137**, 266.
22. Mullis K., Faloona F., Scharf S., Saiki R., Horn G., Erlich H. (1986). *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **51**, 263.
23. Saiki R. K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T. et al. (1988). *Science*, **239**, 487.
24. Schowalter D. B., Sommer S. S. (1989). *Analyt. Biochem.*, **177**, 90.
25. Lion T., Haus O. A. (1990). *Analyt. Biochem.*, **188**, 335.
26. Chamberlain M., Ryan T. (1982). In: *The enzymes* (3rd edn), Vol. I (ed. P. D. Boyer), p. 87. Academic Press, New York.
27. Little P. F. R., Jackson I. J. (1987). In: *DNA cloning*, Vol. III: A practical approach (ed. D. M. Glover), p. 1. IRL Press Oxford.
28. Schenborn E. T., Mierendorf R. C. (1985). *Nucleic Acids Res.*, **13**, 6223.
29. Melton D., Krieg P. A., Rebagliati M. R., Maniatis T., Zinn D., Green M. R. (1984). *Nucleic Acids Res.*, **12**, 7035.
30. Cox K. H., De Leon D. V., Angerer R. C. (1984). *Dev. Biol.*, **101**, 458.
31. Zinn K., diMaio D., Maniatis T. (1984). *Cell*, **34**, 865.
32. Krieg P. A., Melton D. A. (1984). *Nucleic Acids Res.*, **12**, 7057.
33. Melton D. A. (1985). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **82**, 144.
34. Itakura K., Rossi J. J., Wallace R. B. (1984). *Ann. Rev. Biochem.*, **53**, 323.
35. Smith M. (1983) In: *Methods of DNA and RNA sequencing* (ed. S. M. Weissman), p. 23. Praeger, New York.
36. Wallace R. B., Schold M., Johnson M. J., Dembek P., Itakura K. (1981). *Nucleic Acids Res.*, **9**, 3647.
37. Caruthers M. H. (1985). *Science*, **230**, 281.
38. Hunkapiller M. W., Lujan E., Ostrander F., Hood L. E. (1983). *Methods in enzymology*. Vol. 91 (ed. C. H. W. Hirs, S. W. Timashoff), p. 227. Academic Press, New York.
39. Sood A. K., Pereira D., Weissman S. M. (1981). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 616.
40. Jackobs K., Schomaker C., Rudersdorf R., Neill S. D., Kaufman R. J., Mufson A. et al. (1985). *Nature*, **313**, 806.
41. Connor B. J., Reyes A. A., Morin C., Itakura K., Teplitz R. L., Wallace R. B. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 278.
42. Thein S. A. L., Wallace R. B. (1986). In: *Human genetic diseases: A practical approach* (ed. K.E. Davies), p. 33. IRL Press, Oxford.
43. Chu B. C. F., Orgel L. E. (1985). *DNA*, **4**, 327.
44. Bollum F. J. (1974). In: *The enzymes* (ed. P.D. Boyer), Vol. X, p. 145. Academic Press, London.
45. Yousaf S. I., Carrol A. R., Clarke B. E. (1984). *Gene*, **27**, 309.
46. Anderson S., Kingston I. B. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6838.
47. Pringle J. H., Ruprai A. K., Primrose K., Keyte J., Potter L., Close P., Lauder I. (1990). *J. Pathol.*, **162**, 197.

ГИБРИДИЗАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Виктор Т.-В. Чан

1. Введение

Гибридизация — это процесс, в ходе которого одноцепочечная нуклеиновая кислота-мишень при отжиге с комплементарной молекулой (зондом) образует двухцепочечный дуплекс. Обычно последовательность-мишень является членом гетерогенной популяции разных нуклеиновых кислот, так что меченый зонд сначала должен отыскать в этой сложной смеси своего комплементарного «партнера», и только потом образовать с ним комплекс. В качестве зондов могут использоваться как ДНК, так и РНК, а пометить их можно радиоактивными изотопами или нерадиоактивными молекулами-свидетелями (гл. 13), используя химические или ферментативные методы. ДНК-зонды обычно являются двухцепочечными молекулами и перед гибридизацией их необходимо денатурировать, например тепловым способом. РНК-зонды — это, как правило, одноцепочечные молекулы и их денатурация в принципе необязательна, хотя и желательна, поскольку это приводит к разрушению вторичной структуры РНК и увеличению числа способных к гибридизации фрагментов. При гибридизации в растворе оптимальной для ренатурации нуклеиновых кислот является температура примерно на 25 °C ниже температуры плавления (T_m) гибридной молекулы. T_m двухцепочечной молекулы (она определяется как температура, при которой денатурировано 50% молекул) зависит от GC-содержания дуплекса (в %), его длины (в п.н.), концентрации (в М) моновалентных катионов (например, Na^+) и концентрации формамида (в %) в реакционной смеси. Эту зависимость можно представить следующей эмпирической формулой:

$$T_m = 81,5 + 16,6 \log M + 0,41 (\% \text{ G} + \text{C}) - \\ - 0,72 (\% \text{ формамида}) - 500/\text{Размер (п.н.)}$$

Данная формула дает лишь примерное значение T_m . Точную ее величину необходимо определять экспериментально, поскольку она зависит не только от количества остатков гуанина и цитозина, но и от их распределения в молекуле. Необходимо внести поправку и на образование неполностью комплементарных (несовершенных) гибридов: обычно при наличии 1% неспаренных нукле-

отидов T_m снижается на 0,5–1,5 °C. В зависимости от жесткости условий, в которых проводятся гибридизация и отмывание препаратов после гибридизации, задается доля образующихся и сохраняющихся несовершенных гибридов. Гибридизацию обычно проводят в относительно мягких условиях (например, при температуре на 25 °C ниже T_m для полностью комплементарных гибридов), при которых могут образовываться гибриды между частично гомологичными последовательностями. Отмывают препараты в жестких условиях, обеспечивающих сохранение только более совершенных гибридов.

Очень часто гибридизацию проводят не в растворе, а на фильтрах (блот-гибридизация) или *in situ*. Кинетика образования гибридных молекул и их T_m в этих случаях отличаются от таковых для растворов, так что время гибридизации, условия ее проведения и условия промывания приходится определять эмпирически. Более полно принципы молекулярной гибридизации рассмотрены в предыдущих главах и в работе [1].

1.1. Применение блот-гибридизации для изучения болезней человека

Метод блот-гибридизации позволяет выявить аномальные (измененные или экзогенные) нуклеотидные последовательности в любом клиническом образце, из которого можно выделить нуклеиновые кислоты (гл. 12). При этом с помощью блотов, полученных после фракционирования образцов методом гелеэлектрофореза, удается не только выявить ту или иную нуклеиновую кислоту, но и обнаружить изменения в размере молекул, свидетельствующие о структурных нарушениях. Прямое нанесение нуклеиновых кислот на мембранные фильтры (дот-блот) позволяет ответить только на один вопрос: есть ли в данном образце искомая последовательность. Чтобы обнаружить изменения в уровне экспрессии генов, обычно используют Нозерн-блоты (анализ РНК). Этот метод позволяет также зарегистрировать изменение длины мРНК-транскриптов. Все эти нарушения могут существенно повлиять как на количество белкового продукта, образующегося при трансляции мРНК, так и на его биологическую активность. Возможности такого анализа очень хорошо иллюстрирует изучение мутаций в гене ретинобластомы (Rb), в результате которых либо блокируется экспрессия гена, либо образуются аномальные мРНК. Инактивация этого гена играет важную роль в этиологии различных форм рака у челове-

ка. Сходную роль в патогенезе рака играет усиление экспрессии онкогенов или образование продуктов онкогенов с нарушенной структурой; эти аномалии тоже можно выявить с помощью описанных выше методов. Для изучения структуры определенного локуса обычно используют блот-гибридизацию по Саузерну (анализ ДНК). При наличии соответствующих рестриктирующих эндонуклеаз структурные изменения в генах можно выявить методом анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ) (гл. 10). Кроме того, с помощью рестриктаз-изошизомеров, узнающих метилированные и неметилированные нуклеотиды (например, 5-метилцитозин), можно определить степень метилирования данного гена или обнаружить изменения в характере его метилирования. Блот-гибридизация по Саузерну позволяет выявить структурные нарушения в генах при таких наследственных заболеваниях человека, как серповидноклеточная анемия, талассемия, муковисцидоз, мышечная дистрофия Дюшенна и т. д. Этот метод дает возможность также выявить активацию онкогенов в результате их перестроек, точковых мутаций или амплификации либо инактивацию генов — супрессоров опухолей при перестройках в молекуле ДНК, точковых мутациях и делециях (гл. 10).

Методом блот-гибридизации можно обнаружить в клинических образцах те или иные инфекционные агенты: выявлением либо их геномной ДНК с помощью ДНК-блотов, либо соответствующих РНК-транскриптов с помощью РНК-блотов. Более того, используя в качестве зондов фрагменты геномов, высокоспецифичные в отношении определенных штаммов, можно идентифицировать эти штаммы (гл. 19).

2. Блот-гибридизация

Существует два способа переноса нуклеиновых кислот на фильтры:

- а) прямое нанесение растворов нуклеиновых кислот на фильтр (дот- или слот-блоты);
- б) перенос нуклеиновых кислот на мембранные фильтры после их фракционирования в агарозном геле (Саузерн- или Нозерн-блоты).

При переносе ДНК вторым способом обрабатывают препарат рестриктирующими ферментами, проводят гель-электрофорез фрагментов и переносят их из агарозного геля на мембранный

фильтр за счет капиллярных сил. Этот метод был разработан Е. Саузерном [2], и получаемые с его помощью образцы получили название Саузерн-блотов.

Нативная РНК, обладающая вторичной структурой, не способна эффективно связываться с мембранными фильтрами, поэтому ее необходимо сначала денатурировать (перевести в полностью одноцепочечную форму) и лишь потом проводить фракционирование с помощью гель-электрофореза и перенос из агарозного геля на мембранный фильтр. Этот метод получил название Нозерн-блоттинга [3, 4].

Образцы ДНК или РНК на фильтре необходимо фиксировать, чтобы предотвратить их смывание во время гибридизации и при последующих процедурах. Для этого нуклеиновые кислоты пришивают к нейлоновому фильтру с помощью УФ-света или к нитроцеллюлозному фильтру «прожариванием» при 80 °С в вакууме.

Кинетика блот-гибридизации определяется в основном иммобилизованными на фильтре нуклеиновыми кислотами, однако на нее можно повлиять, повысив концентрацию зонда в буфере для гибридизации или добавив в этот буфер анионные полимеры с большой мол. массой (типа декстрансульфата) [5]. В любом случае кинетику процесса трудно предсказать, основываясь только на теоретических предпосылках, в частности потому, что невозможно точно определить концентрацию фиксированной на фильтре нуклеиновой кислоты и ее доступность для зонда. Отметим лишь, что гибридизация в течение ночи (16 ч) в присутствии 10% декстрансульфата позволяет выявить уникальные гены и малые количества мРНК.

2.1. Блот-гибридизация ДНК

Процесс блот-гибридизации ДНК состоит из двух этапов: нанесения ДНК на фильтры и собственно гибридизации.

2.1.1. Изготовление ДНК-блотов по Саузерну и дот-блотов

Для нанесения ДНК на фильтры разработано большое число различных методов и их модификаций, однако некоторые из них требуют применения специального оборудования или мембранных фильтров. Методы, описанные в протоколах 14.1 и 14.2, достаточно просты, эффективны и универсальны. Кроме того, они высокочувствительны и дают воспроизводимые результаты [6].

Протокол 14.1. Перенос ДНК на фильтры по методу Саузерна

Материалы

- 10 × ТВЭ: 0,9 М основной трис, 0,9 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА. pH доводят до 8,1–8,2 сухой борной кислотой
- Бромистый этидий: 10 мг/мл
- Буфер для нанесения: 0,25% бромфеноловый синий, 40% сахара в 1 × ТВЭ
- 0,25 М HCl
- Буфер для денатурации: 1,5 М NaCl, 0,5 М NaOH
- Буфер для нейтрализации: 0,5 М трис-HCl, pH 7,0, 3 М NaCl
- 20 × SSC: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0
- Мембранные фильтры (нитроцеллюлозные или нейлоновые)
- Агароза

Методика

1. Обрабатывают ДНК рестриктирующими эндонуклеазами согласно инструкции фирмы — изготовителя фермента. Обычно для полной рестрикции достаточно инкубации препарата с ферментом в течение ночи при концентрации последнего 5 ЕД на 1 мкг ДНК. Чтобы избежать появления неспецифичной активности, необходимо правильно подобрать буфер для рестрикции (см. гл. 21).
2. Фрагментированную ДНК фракционируют с помощью электрофореза в агарозном геле (вместе с маркерами мол. массы) при градиенте напряжения 1–2 В/см. Длина геля зависит от диапазона длин разделяемых фрагментов. Если этот диапазон достаточно широк, то используют длинный (20 см) гель, а фрагменты близкого размера можно фракционировать в сравнительно коротком (10 см) геле. Обычно для разделения фрагментов длиной от 1 до 15 т.н. используют гели, содержащие 0,8–1% агарозы. В случае фрагментов небольшого размера (400–800 нуклеотидов) необходимо использовать агарозу большей концентрации (1,2–1,4%). И напротив, для разделения больших (15–30 т.н.) фрагментов нужна более низкая концентрация агарозы (0,5–0,7%). Более подробно электрофорез ДНК описан в гл. 12.
3. После электрофореза гель фотографируют. При этом неплохо положить рядом с гелем линейку, чтобы легче было определять подвижность маркерных фрагментов.
4. Осторожно, чтобы не повредить гель, перекладывают его в пластиковую кювету верхней стороной вниз и несколько раз ополаскивают дистиллированной водой.

5. Заливают гель на 30 мин 0,25 М HCl, затем несколько раз ополаскивают его водой¹⁾.
6. Денатурируют ДНК, инкубируя гель в течение 35 мин в буфере для денатурации при слабом покачивании кюветы.
7. Повторяют денатурацию в свежей порции буфера в течение 20 мин; ополаскивают гель несколько раз водой.
8. Нейтрализуют гель в двух сменах буфера для нейтрализации (по 15 мин в каждой смене).
9. Во время обработки геля вырезают фильтр (нитроцеллюлозный или нейлоновый) точно такого же размера, как гель.
10. Замачивают фильтр в воде и переносят его в $20 \times \text{SSC}$. Собирают прибор для переноса (рис. 14.1) и накрывают его полиэтиленовой (пластиковой) пленкой.
11. В пленке вырезают окошко точно такого же размера, как гель, и заливают его небольшим количеством $20 \times \text{SSC}$. Это уменьшит вероятность образования пузырьков воздуха между гелем и фитилем.
12. Помещают гель в окошко и наливают на него небольшое количество $20 \times \text{SSC}$.
13. Накладывают на гель мембранный фильтр так, чтобы между гелем и фильтром не было пузырьков воздуха.
14. На мембранный фильтр кладут два листа фильтровальной бумаги ватман 3ММ, затем — стопку фильтрованной бумаги (или бумаги для блоттинга).
15. Поверх стопки кладут стекло и груз весом около 500 г.
16. Проводят блоттинг в течение 12–16 ч.
17. Переносят гель вместе с фильтром на лист сухой фильтровальной бумаги гелем вверх и мягким карандашом отмечают положение на фильтре геля и гребенки. Снимают гель и окрашивают его бромистым этидием (0,5 мкг/мл) для проверки эффективности блоттинга.
18. Промывают фильтр несколько раз в $5 \times \text{SSC}$ ²⁾, переносят его на лист сухой фильтровальной бумаги и срезают один из уголков фильтра.
19. Нитроцеллюлозный фильтр прожаривают при 80 °C в вакууме в течение 2 ч, а нейлоновый облучают УФ-светом. Для пришивания ДНК к нейлоновому фильтру можно использовать как специальный прибор для образования УФ-сшивок, так и УФ-трансиллюминатор, облучая фильтр в течение 3–5 мин (при этом сторона фильтра, на которую нанесена ДНК, должна быть обращена к источнику УФ-света).

Протокол 14.1 (Продолжение)

20. Обработанный таким образом фильтр можно хранить при 4 °С; нитроцеллюлозные фильтры необходимо хранить под вакуумом.

¹⁾ Необходимое для кислотной апуринизации время зависит от концентрации агарозы, толщины геля и размера анализируемых фрагментов. Нужно исключить излишнюю апуринизацию.

²⁾ Важно после переноса удалить с фильтра все следы агарозы.

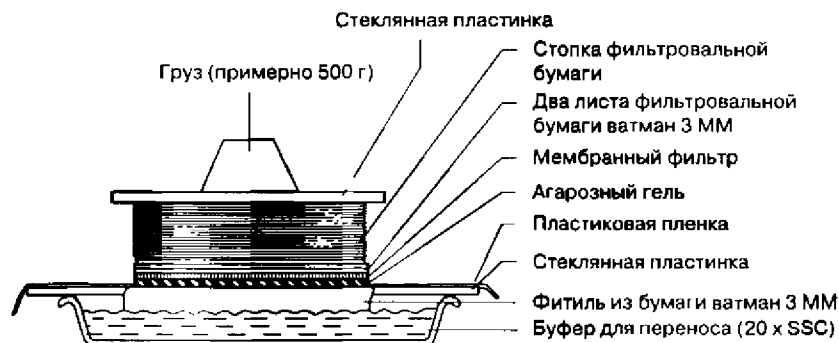


Рис. 14.1. Перенос ДНК из агарозного геля на мембранный фильтр по методу Саузерна.

Протокол 14.2. Изготовление дот-блотов ДНК

Материалы (см. также протокол 14.1)

- Буфер ТЭ: 10 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0
- 20 × SSC
- Мембранные фильтры

Методика

1. Обработывают геномную ДНК ультразвуком при ~ 70 Вт в течение 1–2 мин. Размер получаемых фрагментов должен быть равен 5–10 т.п.н. (его проверяют при помощи электрофореза в агарозном геле; гл. 12).
2. Растворяют ДНК в ТЭ-буфере до нужной концентрации (гл. 12). Обычно используют суммарную геномную ДНК в концентрации 2,5 мкг на 5 мкл буфера.

3. Денатурируют ДНК в кипящей водяной бане в течение 10 мин, быстро переносят ее в лед на 5 мин и собирают ДНК на дне пробирки кратковременным центрифугированием при 12 000 g.
4. Во время денатурации готовят мембранный фильтр нужного размера, замачивают его в дистиллированной воде, затем переносят в $20 \times \text{SSC}$.
5. Кладут фильтр на лист фильтровальной бумаги, также вымоченной в $20 \times \text{SSC}$.
6. Наносят ДНК непосредственно на фильтр¹⁾.
7. Переносят фильтр на лист сухой фильтровальной бумаги и ополаскивают в $5 \times \text{SSC}$ в течение 5 мин.
8. Фиксируют ДНК на мембранном фильтре либо прожариванием при 80°C в вакууме (нитроцеллюлозный фильтр), либо УФ-облучением в течение 3–5 мин (найлоновый фильтр). Подготовленный таким образом фильтр можно хранить при 4°C ; нитроцеллюлозные фильтры необходимо хранить под вакуумом.

¹⁾ Фильтры должны оставаться влажными (но не мокрыми) в течение всего времени нанесения ДНК. ДНК должна быть растворена в буфере с низкой ионной силой (таком, как ТЭ) и не содержать ацетат-ионов. Для получения дот- и слот-блотов можно также использовать фирменные приборы. При нанесении ДНК следует руководствоваться инструкцией фирмы-изготовителя.

2.1.2. Гибридизация

Блот-гибридизацию ДНК можно проводить при разных условиях, и их выбор определяется в основном личными предпочтениями исследователя. В целом при одинаковой жесткости условий гибридизации скорость реассоциации нуклеиновых кислот при высокой (65°C) температуре выше, чем при низкой (42°C) в присутствии формамида. В протоколе 14.3 описана процедура высокотемпературной гибридизации.

Протокол 14.3. Блот-гибридизация ДНК

Материалы (см. также протокол 14.1)

- Предгибризационный буфер: $5 \times \text{SSPE}$, $5 \times$ раствор Денхардта, денатурированная и обработанная ультразвуком ДНК спермы лосося, 100 мкг/мл, 0,1% (о/о) ДСН. При работе с найлоновыми фильтрами концентрацию ДСН необходимо увеличить до 1% (о/о)

Протокол 14.3 (Продолжение)

- Гибридизационная смесь: $5 \times \text{SSPE}$, $5 \times$ раствор Денхардта, денатурированная и обработанная ультразвуком ДНК спермы лосося, 100 мкг/мл, 0,1% (о/о) ДСН, 10% декстрансульфат, денатурированный меченый зонд¹⁾. При работе с нейлоновыми фильтрами концентрацию ДСН необходимо увеличить до 1% (о/о).
- Буфер для отмывания 1: $2 \times \text{SSC}$, 0,1% ДСН
- Буфер для отмывания 2: $0,25 \times \text{SSC}$, 0,1% ДСН
- $20 \times \text{SSC}$
- $20 \times \text{SSPE}$: 3 М NaCl, 0,3 М фосфат натрия, 40 мМ ЭДТА, pH 7,2
- $100 \times$ раствор Денхардта: 2% (в/о) БСА, 2% (в/о) фиколл-400, 2% (в/о) поливинилпирролидон-360

Методика

1. Замачивают фильтр с иммобилизованной ДНК (протоколы 14.1 и 14.2) в воде и помещают его в пластиковый пакет.
2. Добавляют предгибризационный буфер (из расчета 10 мл буфера на 100 см² фильтра), удаляют из пакета все пузырьки воздуха и запаивают его. Помещают пакет между двумя стеклами и проводят предгибризацию при 65 °C в течение 2–4 ч.
3. Срезают один из углов пакета, сливают буфер.
4. Добавляют в пакет с фильтром гибридизационный буфер, содержащий денатурированный зонд (из расчета 4 мл буфера на 100 см² фильтра). Для денатурации зонд можно прогреть в кипящей воде в течение 10 мин.
5. Выдавливают из пакета все пузырьки воздуха и снова его запаивают. Помещают пакет между двумя стеклами²⁾ и проводят гибридизацию при 65 °C в течение 16 ч.
6. Осторожно, чтобы не повредить фильтр, вскрывают пакет и сливают гибридизационную смесь. Эту смесь можно использовать повторно. Если зонд помечен радиоактивным изотопом, следует обеспечить его безопасное хранение и правильное захоронение радиоактивных отходов.
7. Несколько раз ополаскивают фильтр в буфере для отмывания 1 и выдерживают в трех сменах того же буфера при комнатной температуре, по 5 мин в каждой смене.
8. Промывают фильтр при комнатной температуре в трех сменах буфера для отмывания 2, по 5 мин в каждой смене.
9. Промывают фильтр при температуре 55–65 °C в трех сменах буфера для отмывания 2, по 30 мин в каждой смене³⁾.
10. Аккуратно промокают фильтр и заворачивают его в пластиковую пленку.

11. При работе с изотопно меченными зондами проводят радиоавтографию в специальной кассете. Снизу в кассету помещают усиливающий экран, на него кладут рентгеновскую пленку и сверху помещают фильтр так, чтобы сторона с ДНК была обращена к пленке (протокол 14.8). Если используются нерадиоактивно меченные зонды, то фильтры обрабатывают блокирующими агентами, чтобы предотвратить фоновое окрашивание при обработке фильтра детектирующими реактивами (протокол 14.9). Фильтр можно хранить во влажном состоянии при 4 °С.

¹⁾ Изотопно меченные зонды должны иметь удельную радиоактивность ~ 10⁹ имп./мин на 1 мкг (гл. 13). Обычно достаточно, чтобы радиоактивность гибридизационной смеси составляла 10⁶–10⁷ имп./мин на 1 мл. Кинетика реассоциации нерадиоактивно меченных зондов немного отличается от таковой для ³²P-зондов, и для достижения оптимальной чувствительности необходима более высокая концентрация зонда. Эту концентрацию можно рассчитать по следующей формуле:

$$A = B/50 \cdot 1/C \cdot 16/D,$$

где *A* — необходимая концентрация зонда (мкг/мл)

B — «сложность» зонда (см. [1])

C — концентрация декстрансульфата (в %)

D — время гибридизации (ч)

Концентрация зондов, полученных методом ник-трансляции, обычно составляет 50–100 нг/мл.

²⁾ Для предотвращения утечки изотопно меченных зондов гибридизационный пакет помещают во второй запаянный пакет.

³⁾ Жесткость условий, при которых проводятся последние отмывания, можно повысить, уменьшив концентрацию SSC (до 0,1 × вместо 0,25 ×). Это обычно не сопровождается снижением чувствительности.

2.2. Блот-гибридизация РНК

При блот-гибридизации РНК происходит гибридизация иммобилизованной на фильтре РНК (суммарной РНК или мРНК) с мечеными ДНК- или РНК-зондами. Ниже мы рассмотрим способы получения РНК-блотов и их гибридизацию с ДНК-зондами.

2.2.1. Изготовление Нозерн-блотов и РНК-дот-блотов

Нативная РНК имеет четко выраженную вторичную структуру и поэтому плохо связывается с твердым матриксом (мембранными фильтрами). Для повышения эффективности связывания ее необходимо полностью денатурировать. Кроме того, наличие у РНК вторичной структуры приводит к изменению ее подвижности в геле и делает невозможным точное определение размера молекул. Для де-

натурации РНК используют глиоксаль/диметилсульфоксид (ДМСО) [7] или формамид/формальдегид [8]. Эти методы одинаково эффективны, однако чаще применяют гели, содержащие формальдегид, поскольку их проще готовить и они более надежны. В протоколах 14.4 и 14.5 соответственно описаны методы денатурации РНК при помощи глиоксаля/ДМСО и формальдегида/формамида.

Протокол 14.4. Изготовление Нозерн-блотов с РНК, денатурированной глиоксалем/ДМСО

Материалы (см. также протокол 12.10)

Все реактивы должны быть свободны от РНКаз или обработаны ДЭПК.

- 10 × буфер для электрофореза: 100 мМ фосфат натрия, рН 7,0
- Смесь для денатурации: 3 мл 6 М глиоксаля, 7,5 мл ДМСО, 1,5 мл 10 × буфера для электрофореза. 12 мкл смеси для денатурации добавляют к 3 мкл раствора РНК (содержащего до 20 мкг РНК)
- Буфер для нанесения: 50% глицерин, 0,25% бромфеноловый синий в 1 × буфере для электрофореза
- Агароза

Методика

1. Денатурируют РНК, выдерживая ее в течение 1 ч в смеси для денатурации при 50 °С.
2. Фракционируют РНК с помощью электрофореза в 1 × буфере для электрофореза. Обычно используют гель длиной 10–15 см, содержащий 1,1% (в/о) агарозу. Если размер молекул РНК ≤ 1 т.н., то концентрацию агарозы нужно повысить до 1,3–1,5%. Подробнее об этом см. в протоколе 12.10.
3. Отрезают дорожки, на которые были нанесены маркеры мол. масс, и окрашивают их бромистым этидием (0,5 мкг/мл в 25 мМ трис-НСl, рН 9,0) в течение 30–60 мин.
4. На УФ-трансиллюминатор рядом с гелем (дорожка с маркером) кладут линейку и фотографируют их.
5. Глиоксилированную РНК переносят из агарозного геля на мембранный фильтр сразу после электрофореза без какой-либо дополнительной обработки геля (такая обработка уменьшила бы эффективность процесса). Для переноса используют такой же прибор, как в случае ДНК (протокол 14.1). Фильтр предварительно замачивают в 20 × SSC; этот же буфер применяют для переноса. Процесс обычно занимает 16 ч.

6. По окончании переноса гель вместе с фильтром помещают на лист сухой фильтровальной бумаги гелем вверх и мягким карандашом отмечают положение на фильтре геля и лунок.
7. Снимают гель и окрашивают его бромистым этидием (0,5 мкг/мл в 25 мМ трис- HCl) для проверки эффективности переноса.
8. Промывают фильтр несколько раз в $20 \times \text{SSC}$ ¹⁾ и подравнивают его края.
9. Нитроцеллюлозный фильтр прожаривают при 80 °С в вакууме в течение 2 ч, а нейлоновый облучают УФ-светом в течение 3–5 мин на УФ-трансillюминаторе. Обработанный таким образом фильтр можно хранить при 4 °С; нитроцеллюлозные фильтры необходимо хранить под вакуумом.

¹⁾ Важно после переноса промыть фильтр в $20 \times \text{SSC}$ для полного удаления всех следов агарозы. При необходимости РНК можно смыть с фильтра до ее постоянной фиксации буфером с низкой ионной силой.

Протокол 14.5. Изготовление Нозерн-блотов с РНК, денатурированной формальдегидом/формамидом

Материалы (см. также протокол 12.11)

Все реактивы должны быть свободны от РНКаз или обработаны ДЭПК.

- Формальдегид: 37% водный раствор (см. гл. 12)
- Формамид: хранят разлитым на аликвоты при –70 °С (см. гл. 12)
- 10 × буфер для электрофореза: 0,2 М 3-(N -морфолино)пропансульфоновая кислота (MOPS), 75 мМ ацетат натрия, 20 мМ ЭДТА, pH 7,0
- Буфер для нейтрализации: 0,25 М трис- HCl , pH 7,5, 3 М NaCl
- Буфер для нанесения: 50% глицерин, 0,25% бромфеноловый синий в 1 × буфере для электрофореза

Методика

1. Растворяют РНК (20 мкг) в 3,3 мкл воды и добавляют 1,5 мкл 10 × буфера для электрофореза, 7,5 мкл формамида и 2,7 мкл формальдегида.
2. Денатурируют РНК прогреванием при 65 °С в течение 15 мин и фракционируют ее в агарозном геле, содержащем 2,2 М формальдегид. Обычно используют гель длиной 10–15 см, содержащий 1,1% (в/о) агарозы. Если длина молекул ≤ 1 т.н., то концентрация агарозы должна быть выше, 1,3–1,5%. Подробнее о гель-электрофорезе в присутствии формальдегида см. в протоколе 12.10.

Протокол 14.5 (Продолжение)

3. После электрофореза отрезают дорожки, на которые были нанесены маркеры мол. масс, и окрашивают их в течение 30–60 мин бромистым этидием (0,5 мкг/мл в воде).
4. На УФ-трансиллюминатор рядом с гелем (дорожка с маркером) кладут линейку и фотографируют их.
5. Несколько раз ополаскивают гель водой для удаления формальдегида. Можно также обработать гель в течение 10–20 мин 0,05 М NaOH; при этом происходит частичный гидролиз РНК, что повышает эффективность переноса.¹⁾
6. После обработки NaOH ополаскивают гель несколько раз водой, затем промывают в буфере для нейтрализации в течение 30–45 мин.
7. Собирают прибор для переноса (см. протокол 14.1). Перед использованием мембранные фильтры насыщают $20 \times \text{SSC}$, этот же буфер используют при переносе.
8. Осуществляют перенос согласно протоколу 14.4, начав с п. 6.

¹⁾ Время обработки NaOH зависит от концентрации агарозы, толщины геля и размера интересующих исследователя молекул РНК. При этом необходимо быть уверенным в том, что гидролиз не чрезмерно сильный.

Протокол 14.6. Изготовление РНК-дот-блотов

Материалы (см. также протоколы 12.10 и 12.11)

Все реактивы должны быть свободны от РНКаз или обработаны ДЭПК.

- 6 М глиоксаль: хранят разлитым на аликвоты при -20°C
- Формальдегид: 37% водный раствор
- Формамид: хранят разлитым на аликвоты при -70°C
- $20 \times \text{SSC}$: (см. протокол 12.1)

Методика

1. Вырезают мембранный фильтр нужного размера, ополаскивают его в воде и вымачивают в $20 \times \text{SSC}$.
2. Денатурируют РНК с помощью глиоксаля или формальдегида/формамида.
 - а. Для денатурации с помощью глиоксаля добавляют следующие реактивы:

- 3 мкл раствора РНК (до 20 мкг)
- 2 мкл 6 М глиоксаля
- 5 мкл $20 \times \text{SSC}$

Прогревают образцы в течение 1 ч при 50°C

б. Для денатурации РНК с помощью формальдегида/формамида добавляют следующие реактивы:

- 2 мкл раствора РНК (до 20 мкг)
- 5 мкл формамида
- 2 мкл формальдегида
- 1 мкл $20 \times \text{SSC}$

Прогревают образцы в течение 15 мин при 65°C .

3. Охлаждают денатурированную РНК во льду в течение 5 мин и собирают ее на дне пробирки кратковременным центрифугированием при 12 000 g.
4. Кладут мембранный фильтр на лист фильтровальной бумаги, припитанный $20 \times \text{SSC}$.
5. Наносят образцы денатурированной РНК на фильтр, разделив их на две равные порции¹⁾.
6. Переносят фильтр на лист сухой фильтровальной бумаги, подсушивают его на воздухе и несколько раз ополаскивают в $20 \times \text{SSC}$.
7. Фиксируют РНК на фильтре либо прожариванием при 80°C в вакууме (нитроцеллюлозный фильтр), либо УФ-облучением в течение 3–5 мин (найлоновый фильтр). Подготовленный таким образом фильтр можно хранить при 4°C ; при этом нитроцеллюлозные фильтры необходимо хранить под вакуумом.

¹⁾ Фильтры должны оставаться влажными (но не мокрыми) все время, пока наносится РНК. Для получения дот- и слот-блотов можно использовать также фирменные приборы для фильтрации. При нанесении РНК следует руководствоваться инструкцией фирмы-изготовителя.

2.2.2. Гибридизация

Блот-гибридизацию РНК обычно проводят при 42°C в присутствии 50% формамида. Чтобы повысить скорость процесса, иногда проводят гибридизацию при более высокой температуре, понизив при этом концентрацию формамида (для сохранения жесткости условий гибридизации), например, используют следующие условия: 48°C , 40% формамид. Однако следует иметь в виду, что при высоких температурах РНК деградирует и смывается с фильтра, так что необходимо поддерживать баланс между

эффективностью гибридизации и стабильностью РНК. В протоколе 14.7 описана процедура гибридизации для стандартных условий: 42 °С, 50% формамид.

Протокол 14.7. Блот-гибридизация РНК

Материалы (см. также протокол 14.3)

Все реактивы должны быть свободны от РНКаз или обработаны ДЭПК.

- 25 мМ трис-НСl, pH 8,5
- Предгибризационный буфер: 5 × SSPE, 5 × раствор Денхардта, денатурированная и обработанная ультразвуком ДНК спермы лосося, 100 мкг/мл, 0,1% (о/о) ДСН, 50% формамид. При работе с нейлоновыми фильтрами концентрацию ДСН необходимо увеличить до 1% (о/о)
- Гибридизационная смесь: 5 × SSPE, 5 × раствор Денхардта, денатурированная и обработанная ультразвуком ДНК спермы лосося, 100 мкг/мл, 0,1% (о/о) ДСН, 50% формамид, 10% декстрансульфат, денатурированный меченый зонд (см. протокол 14.3). При работе с нейлоновыми фильтрами концентрацию ДСН необходимо увеличить до 1% (о/о)
- Буфер для отмывания 1: 2 × SSC, 0,1% ДСН
Буфер для отмывания 2: 0,25 × SSC, 0,1% ДСН
- 20 × SSC: (см. протокол 14.1)
- 20 × SSPE: (см. протокол 14.3)
- 100 × раствор Денхардта: (см. протокол 14.3)

Методика

1. Промывают фильтры в стерильной дистиллированной обработанной ДЭПК воде. Фильтры с РНК, денатурированной глиоксалем, необходимо подвергнуть тепловой обработке, чтобы удалить из РНК остатки глиоксаля. Для этого прогревают фильтры при 80 °С в течение 10 мин в 25 мМ трис-НСl, pH 8,5, а затем медленно охлаждают до комнатной температуры. Если РНК денатурировали формальдегидом/формамидом, то фильтры перед гибридизацией можно не обрабатывать.
2. Помещают фильтр в пластиковый пакет, добавляют предгибризационный буфер (из расчета 10 мл буфера на 100 см² фильтра).
3. Выдавливают из пакета все пузырьки воздуха, запаивают его и проводят предгибридизацию, выдержав пакет между двумя стеклами в течение 2–4 ч при 42 °С.

4. Срезают один из углов пакета, сливают предгибризационный буфер и заменяют его на гибридизационную смесь, содержащую денатурированный зонд (из расчета 4 мл смеси на 100 см² фильтра). Для денатурации зонд можно просто выдерживать в кипящей воде в течение 10 мин.
5. Выдавливают из пакета все пузырьки воздуха и снова его запаивают. Проводят гибридизацию, выдержав пакет между двумя стеклами в течение 16–40 ч при 42 °C¹⁾.
6. Осторожно, чтобы не повредить фильтр, вскрывают пакет и сливают гибридизационную смесь (ее можно использовать повторно). Если работают с изотопно меченными зондами, следует обеспечить их правильное хранение и захоронение радиоактивных отходов.
7. Один раз ополаскивают фильтр в буфере для отмывания 1 и выдерживают в трех сменах этого же буфера, по 5 мин в каждой смене, при комнатной температуре.
8. Промывают фильтр в трех сменах буфера для отмывания 2, по 5 мин в каждой смене, при комнатной температуре, затем в трех сменах того же буфера, по 30 мин в каждой смене, при 45–55 °C²⁾.
9. Промокают фильтр и заворачивают его в пластиковую пленку.
10. Выявляют гибридизовавшийся зонд радиоавтографическими (изотопная метка) или гистохимическими (неизотопная метка) методами (см. протоколы 14.8 и 14.9).

¹⁾ Чтобы предотвратить утечку радиоактивно меченных зондов, пакет с гибридизационной смесью необходимо поместить во второй пакет и тоже запаять его.

²⁾ Жесткость условий, при которых проводят последние отмывания, можно повысить, уменьшив концентрацию SSC до 0,05 × (вместо 0,1 ×). Чувствительность метода при этом обычно не снижается, поскольку при одних и тех же условиях T_m у ДНК–РНК- и РНК–РНК-гибридов выше, чем у гибридов ДНК–ДНК.

Протокол 14.8. Выявление зондов с помощью радиоавтографии

Материалы

- Кассета для радиоавтографии
- Рентгеновская пленка (Kodak X-Omat AR или ее аналоги)
- Усиливающие экраны (DuPont Cronex Lightning-Plus или их аналоги)

Протокол 14.8 (Продолжение)

Методика

1. После гибридизации слегка промокают фильтр и заворачивают его в пластиковую пленку. Особенно важно сохранить фильтр влажным в тех случаях, когда предполагается использовать его в других опытах по гибридизации¹⁾.
2. В кассету для радиоавтографии помещают усиливающий экран, на него кладут рентгеновскую пленку, а сверху — фильтр, так чтобы его сторона с фиксированной ДНК была обращена к пленке. Если используются две рентгеновские пленки, то вторую пленку кладут поверх фильтра, затем помещают на нее второй усиливающий экран²⁾. Все операции проводят в темноте.
3. Кассету закрывают, заворачивают в алюминиевую фольгу и экспонируют при -70°C .
4. Проявляют пленку. Для выявления уникальных генов на Саузерн-блотах или небольших количеств мРНК в препаратах poly(A)⁺-РНК на Нозерн-блотах обычно достаточно экспозиции в течение ночи. Если используются две рентгеновские пленки, то первую из них проявляют после экспозиции в течение ночи и, определив из радиоавтографа уровни сигнала и фона, находят время экспозиции второй пленки, отвечающее оптимальному отношению сигнал/шум.

¹⁾ Изотоп ^{32}P является источником жесткого β -излучения, поэтому при работе с ним необходимо соблюдать осторожность и контролировать дозу облучения, получаемую персоналом. Период полураспада ^{32}P равен 14 сут, так что интенсивность его излучения каждые сутки снижается лишь на 5%. В результате ^{32}P -зонды приобретают то преимущество, что интенсивность сигнала можно повысить в 6 раз, увеличив время экспозиции от 1 до 7 сут (при условии, что фон остается на прежнем уровне).

²⁾ Если ожидается, что сигнал будет очень слабым, то для дополнительного повышения чувствительности радиоавтографии можно использовать для одной рентгеновской пленки два усиливающих экрана. Для этого помещают рентгеновскую пленку между двумя усиливающими экранами и кладут ее в таком виде на фильтр, находящийся в кассете. При этом фильтр должен быть обращен к пленке той стороной, на которой фиксирована нуклеиновая кислота.

2.3. Выявление гибридизовавшихся зондов

Чтобы обнаружить и локализовать последовательности-мишени, нужно выявить гибридизовавшиеся зонды. В опытах по гибридизации используются как изотопно, так и неизотопно

меченные зонды. В первом случае их выявляют с помощью радиоавтографии; этот метод достаточно прост, но может потребовать длительной экспозиции. Выявление нерадиоактивных зондов — более сложный и трудоемкий процесс, основанный на использовании иммунохимических и аффинных методов. Однако эти методы более безопасны и обычно позволяют быстрее получить результаты.

2.3.1. Выявление изотопно меченных зондов

При блот-гибридации обычно используются зонды, меченные изотопом ^{32}P . Образующиеся при его распаде высокоэнергетические β -частицы регистрируют с помощью рентгеновской пленки. Чувствительность детекции можно существенно повысить, используя усиливающий экран.

2.3.2. Выявление неизотопно меченных зондов

Для нерадиоактивного мечения зондов используют несколько разных молекул-свидетелей, но, по-видимому, наиболее распространенной меткой является биотин. В протоколе 14.9 описан способ детекции биотинилированных зондов [5], но этот же метод с незначительными модификациями подходит и в случае других молекул-свидетелей. В принципе нерадиоактивный и радиоактивный способы мечения обеспечивают одинаковую чувствительность детекции, однако технически первый из них более сложный. Это связано со следующими факторами.

- а. При нерадиоактивном мечении чувствительность детекции очень сильно зависит от уровня включения молекулы-свидетеля в зонд. Если он повышается, то сигнал усиливается, но одновременно снижается эффективность гибридизации зонда с мишенью. При понижении уровня включения наблюдается обратная картина. Таким образом, оптимальный уровень включения необходимо подбирать опытным путем, но обычно он составляет примерно 30%.
- б. Используемые при детекции нерадиоактивных меток реактивы нестойки, что может приводить к уменьшению чувствительности детекции, повышению фона и появлению неспецифического окрашивания. Эту проблему, впрочем, можно решить, если использовать имеющиеся сейчас в продаже высококачественные реактивы.

- в. Поскольку время, в течение которого протекает ферментативная реакция, не превышает 24 ч, увеличение времени инкубации в растворе субстрата не ведет к усилению сигнала, но зато повышает фон. Таким образом, в отличие от изотопно меченных зондов чувствительность детекции нерадиоактивных зондов ограничивается временем протекания ферментативной реакции.

Протокол 14.9. Выявление биотинилированных зондов

Материалы

- Буфер $10 \times \text{НТМ}$: 1 М NaCl, 1 М трис-HCl, pH 7,5, 50 мМ MgCl_2
- Блокирующий раствор
 - Для нитроцеллюлозных фильтров: 0,5% (о/о) твин-20 в $1 \times \text{НТМ}$
 - Для нейлоновых фильтров: 0,5% (о/о) твин-20, 1% обезжиренное сухое молоко [или 0,5% (в/о) казеин] в $1 \times \text{НТМ}$
- Инкубационный буфер: 0,05% (о/о) твин-20 в $1 \times \text{НТМ}$
- Конъюгат стрептавидина с щелочной фосфатазой (Dakopatts)
- Нитросиний тетразолий (НСТ): 75 мг/мл в 70% диметилформамиде (ДМФ)
- 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (БХИФ): 50 мг/мл в ДМФ
- Буфер для отмывания: 0,5% (о/о) твин-20 в $1 \times \text{НТМ}$
- Субстратный буфер: 0,1 М трис-HCl, pH 9,5, 0,1 М NaCl, 10 мМ MgCl_2 , 0,1 мМ ZnCl_2

Методика

1. Отмыв фильтр после гибридизации (см. протоколы 14.3 и 14.7), ополаскивают его несколько раз в блокирующем растворе и выдерживают в этом растворе в течение 60 мин при комнатной температуре.
2. Выдерживают фильтр в растворе с детектирующими реагентами в оптимальной концентрации при температуре 22–37 °C в течение 10–30 мин; точное время и температура инкубации определяются тем, какие реактивы используются¹⁾. В случае биотинилированных зондов инкубацию лучше всего проводить в растворе стрептавидин/щелочная фосфатаза в течение 10 мин при комнатной температуре. При работе со всеми реактивами необходимо точно выполнять установленные фирмой-производителем условия хранения и использования детектирующих реактивов.

3. Промывают фильтр в трех сменах буфера для отмывания, по 5 мин в каждой смене, и в двух сменах субстратного буфера, по 5 мин в каждой смене.
4. Готовят свежий раствор субстрата для колориметрического определения щелочной фосфатазы, для чего к 10 мл субстратного буфера добавляют 44 мкл НСТ и 33 мкл БХИФ. В этом растворе инкубируют фильтр в темноте в пластиковой чашке Петри в течение 16–20 ч²⁾.
5. После появления окраски тщательно промывают фильтр в воде.

¹⁾ Концентрации детектирующих реактивов подбирают опытным путем. Обычно в случае биотинилированных зондов оптимальное разведение стрептавидина/щелочной фосфатазы в инкубационном буфере 1:250–1:10 000.

²⁾ Щелочную фосфатазу можно определить также с помощью хемилюминисцентных методов. Для этого фильтр после гибридизации помещают в пластиковый пакет с субстратным буфером, содержащим 0,25 мМ 4-метокси-4-(3-фосфатфенил)спиро[1,2-диоксэтан-3,2'-адамантан] (Sigma); на 100 см² фильтра используется 1 мл этого буфера. Из пакета выдавливают пузырьки воздуха и запаивают его. Испускаемые при хемилюминисценции фотоны можно зарегистрировать с помощью рентгеновской пленки (как в случае радиоавтографии; см. протокол 14.8). Время экспозиции зависит от содержания молекул-мишеней и варьирует от 30 мин до 3 ч.

3. Хранение фильтров после гибридизации

После выявления зонда фильтры можно хранить во влажном состоянии при 4 °С. Можно также сначала смыть гибридизовавшийся зонд и хранить фильтр в сухом виде при 4 °С или сразу использовать для повторной гибридизации. Обычно для смывания зонда фильтр выдерживают в трех сменах 0,025% ДСН, по 30 мин в каждой смене, при 68 °С. Необходимость в отмывании отпадает, если после гибридизации с радиоактивно меченным зондом фильтр предполагается хранить до повторной гибридизации длительное время, поскольку по прошествии времени, равного пяти периодам полураспада, радиоактивность зонда уменьшается в 2⁵ раз, т. е. составляет всего 3% от исходной величины.

Если используются нерадиоактивные зонды, то, хотя фермент (щелочная фосфатаза) быстро инактивируется, сама молекула-свидетель остается стабильной, так что отмывание фильтра от гибридизовавшегося зонда абсолютно необходимо. Не рекомендуется повторно использовать для гибридизации те фильтры, на которых проводилась колориметрическая детекция нерадиоактивных зондов; особенно это относится к нитроцеллюлозным

фильтрам. Это связано с тем, что конечный продукт ферментативной реакции, формазан, растворяют с помощью диметилформамида, растворяющего также нитроцеллюлозу. Найлоновые фильтры устойчивы к его действию, однако отмывание их от формазана и гибридизовавшегося зонда — очень трудоемкая и длительная процедура.

Литература

1. Hames B. D., Higgins S. J. (ed.) (1985). Nucleic acid hybridisation: a practical approach. IRL Press, Oxford.
2. Southern E. M. (1975). J. Mol. Biol., 98, 503.
3. Thomas P. S. (1980). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 5201.
4. Seed B. (1982). In: Genetic engineering: principles and methods (ed. J. K. Setlow, A. Hollaender) Vol. 4, 91. Plenum Publishing, New York.
5. Wahl G. M., Stern M., Stark G. R. (1979). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 3683.
6. Chan V. T. W., Fleming K. A., McGee, J. O'D. (1985). Nucleic Acids Res., 12, 8083.
7. McMasters G. K., Carmichael G. G. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 4835.
8. Lehrach H., Diamond D., Wozney J. M., Boedtker H. (1977). Biochemistry, 16, 4743.

ПОЛИМЕРАЗНАЯ ЦЕПНАЯ РЕАКЦИЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ БИОПТАТОВ

Даррил К. Шибата

1. Введение

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) впервые была осуществлена в 1985 г. на фирме Cetus [1, 2], а последующее использование в ПЦР термостабильной ДНК-полимеразы [3] существенно расширило возможности ее применения как в научных целях, так и в клинике. В этой главе мы вкратце рассмотрим теоретические основы ПЦР и применение этого метода для молекулярно-генетического исследования образцов тканей. Основное внимание будет уделено практическим аспектам, важным для анализа обычных тканевых биоптатов.

1.1. Полимеразная цепная реакция

ПЦР — это осуществляемая *in vitro* специфическая амплификация нуклеиновых кислот, инициируемая синтетическими олигонуклеотидными праймерами; основные ее этапы представлены на рис. 15.1. ПЦР-цикл состоит из тепловой денатурации ДНК, ее отжига с праймером и удлинения цепи (элонгации); смена этих этапов происходит в результате простого изменения температуры. Праймеры при этом ориентируются на матрице так, что число раундов репликации растет экспоненциально, соответственно увеличивается и число копий специфической нуклеотидной последовательности. Читатели, интересующиеся деталями ПЦР, которых здесь не касаемся, могут обратиться к прекрасным обзорам [4, 5].

Применение молекулярных методов для целей клинической диагностики ограничивается их невысокой чувствительностью и длительностью анализа. Так, для выявления нуклеиновой кислоты-мишени методом гибридизации *in situ* с применением радиоактивно меченного зонда необходимо, чтобы мишень присутствовала в препарате в нескольких тысячах копий. Нередко число аномальных последовательностей в клиническом препарате диагностически значимо, но меньше этой величины и гибридизация может дать ложноотрицательный результат. В отличие от этого ПЦР позволяет выявить уникальную нуклеотидную последовательность. Для этого в реакционную смесь добавляют в большом избытке специфические

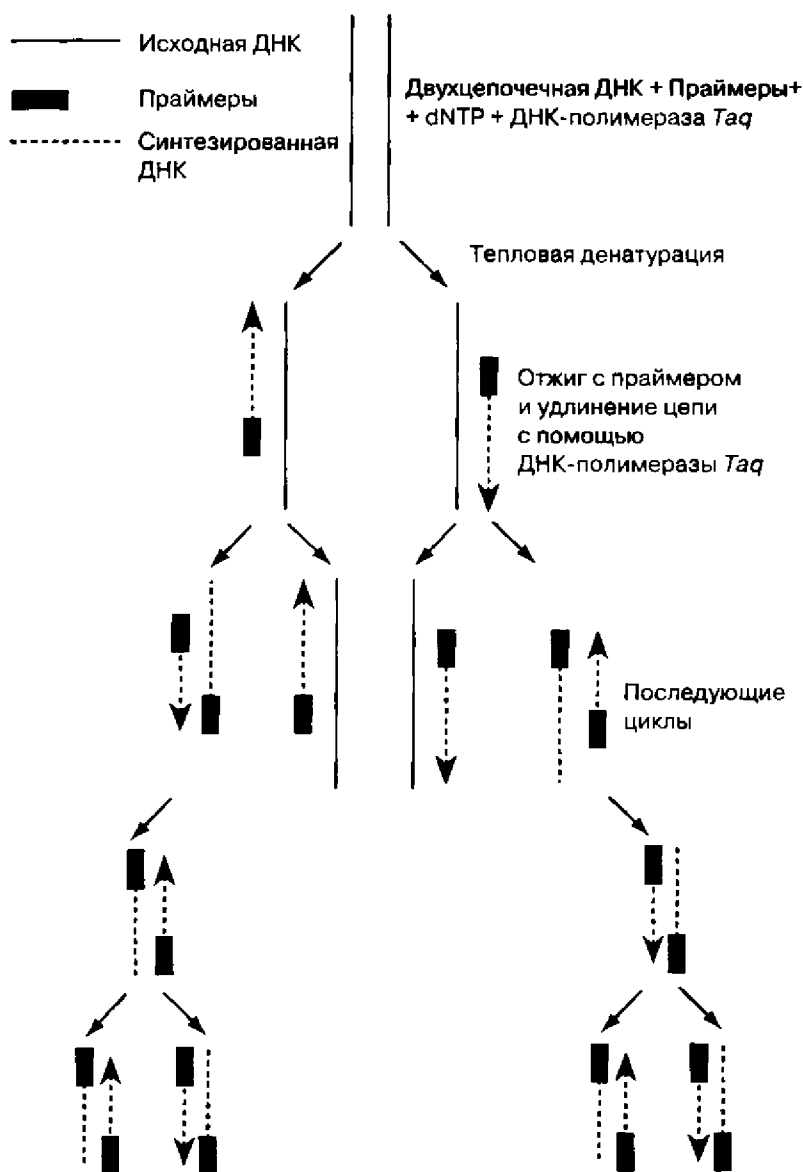


Рис. 15.1. Полимеразная цепная реакция. Праймеры подбирают таким образом, чтобы обеспечить специфическую амплификацию фрагмента ДНК определенного размера.

Таблица 15.1. Сравнение различных методов гибридизации

	ПЦР	Блот-гибридизация по Саузерну	Гибридизация <i>in situ</i>
Чувствительность	1/100 000 ¹⁾	1/100	10 мишеней на клетку
Специфичность	Высокая	Высокая	Высокая
Длительность анализа	1 сут	1 нед	1 сут
Возможность клеточ- ной локализации	Нет	Нет	Да

¹⁾ 1 копия на 100 000 клеток.

для данной последовательности олигонуклеотидные праймеры («амплимеры»), которые образуют с ней комплекс, и проводят репликацию ДНК *in vitro*. Поскольку амплимеры гибридизуются с обеими цепями ДНК, то и нативная последовательность, и синтезируемые ПЦР-продукты могут служить матрицами в последующих раундах репликации, в результате чего число копий уникальной последовательности экспоненциально увеличивается (рис. 15.1). Благодаря этому последовательности, присутствующие в клиническом препарате в минимальном количестве (одна или несколько копий) и не поддающиеся обнаружению никакими другими методами, легко выявляются с помощью ПЦР. Образно говоря, ПЦР позволяет найти «иголку в стоге сена» — всего одну аномальную последовательность на 100 000–1 000 000 нормальных клеток.

Экспоненциальное увеличение числа копий молекулы-мишени не только обеспечивает высокую чувствительность метода, но и облегчает их выявление. Каждый раунд ПЦР занимает от 2 до 5 мин, и обычно для достижения необходимой чувствительности достаточно 25–50 раундов, т. е. 2–4 ч. Таким образом, весь анализ можно провести в течение одного дня. Кроме того, поскольку содержание ПЦР-продуктов достаточно велико, можно использовать неизотопные методы детекции. В табл. 15.1 приведены данные, позволяющие сравнить метод ПЦР с другими молекулярно-генетическими методами исследования. Видно, что он обладает двумя важными преимуществами: высокой чувствительностью и непродолжительностью анализа.

1.2. Амплификация РНК

РНК тоже можно амплифицировать с помощью ПЦР, предварительно получив ее кДНК-копию. Поскольку РНК менее стабильна, чем ДНК, ее выявление представляет собой более слож-

ную задачу, особенно если имеющиеся клинические препараты не оптимальны. В данной главе основное внимание будет уделено методам выявления ДНК.

2. Общие положения

Способы оптимизации условий, в которых протекает ПЦР, рассмотрены в обзорах [4, 5]. Важную роль играют такие факторы, как число циклов, временные и температурные характеристики процесса, концентрация амплимеров, ионов магния, дезоксинуклеотидтрифосфатов, фермента. Стандартные реакционные смеси для ПЦР производит ряд коммерческих фирм (например, Perkin—Elmer Cetus). Сфера применения ПЦР все более расширяется, и в настоящее время описаны процедуры выявления различных последовательностей-мишеней, а для многих случаев в продаже имеются соответствующие наборы реактивов. В клинической практике желательно применять наборы для ПЦР-анализа, производимые коммерческими фирмами. Мы рассмотрим применение описанных ПЦР-методов в клинике и возможность их модификации с целью проведения рутинных клинических анализов.

2.1. Подбор праймеров

ПЦР-праймеры, или амплимеры, обычно имеют размер от 18 до 25 нуклеотидов. Их можно синтезировать с помощью автоматических синтезаторов ДНК, имеющихся в большинстве крупных исследовательских центров. Количества получаемых таким образом олигонуклеотидов (0,2—1 мкмоль) обычно достаточно для проведения нескольких сотен или тысяч ПЦР-реакций. Праймеры можно также приобрести у ряда коммерческих фирм (например, DuPont, Perkin—Elmer Cetus). Часто в 5'-концевой участок праймеров для упрощения клонирования ПЦР-амплифицированной ДНК вводят сайты узнавания для рестриктирующих эндонуклеаз, но в клинической практике в таких праймерах обычно нет необходимости.

Подбор праймеров — ключевое звено ПЦР, поскольку именно ими определяется возможность амплификации и выявления нужной последовательности, а также чрезвычайная гибкость метода. Простое варьирование праймеров позволяет выявлять многие патогенные микроорганизмы и генетические нарушения при минимальных изменениях в методике. Освоив метод ПЦР и обнаружив с его помощью какую-то одну последовательность, легко перейти к обнаружению других.

ПЦР-амплифицированные фрагменты ДНК имеют разный размер. Он определяется суммой размера праймеров и расстояния между их 3'-концами и в большинстве случаев лежит в диапазоне 100–300 нуклеотидов. Возможна амплификация (но обычно менее успешная) последовательностей-мишеней длиной более 1000 п.н. (Скорость репликации с помощью ДНК-полимеразы *Taq* составляет 35–100 нуклеотидов в секунду.) В клинической практике, особенно при работе с недостаточно хорошо сохранившимися образцами тканей, часто приходится иметь дело с деградированной ДНК (см. ниже); в этих случаях лучше ориентироваться на последовательности-мишени небольшого размера.

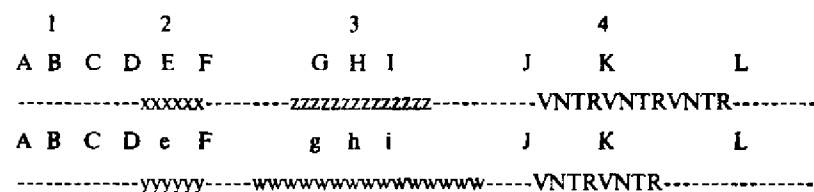
2.1.1. Консервативные последовательности-мишени

Чтобы ПЦР прошла успешно, должна произойти гибридизация амплимера с нужной последовательностью-мишенью. Если эта последовательность слегка различается у разных индивидумов или у микроорганизмов из разных изолятов (т. е. имеет место полиморфизм), может произойти ее неполное спаривание с амплимером и нарушение нормальной амплификации, что приведет к получению ложноотрицательного результата. К счастью, у человека большая часть геномных последовательностей консервативна и не различается у разных индивидумов, так что обычно для них можно использовать один набор «консервативных» (generic) амплимеров. На рис. 15.2 приведен пример таких амплимеров и соответствующих гибридизационных зондов.

2.1.2. Полиморфные последовательности-мишени

В случае полиморфных мишеней, не полностью гомологичных выбранным праймерам, гибридизация и удлинение праймеров могут вообще не произойти. Наиболее критичным при этом является неправильное соответствие матрице 3'-концевых нуклеотидов амплимера. В работе [6] показано, что небольшое нарушение гомологии между 3'-концом праймера и матрицей не сказывается на ходе реакции, если концентрация нуклеозидтрифосфатов находится на уровне, обычном для ПЦР. Например, праймеры, содержащие на 3'-конце остаток тимидина, удлиняются несмотря на нарушение спаривания. При низкой же концентрации нуклеозидтрифосфатов такое нарушение блокирует амплификацию. Таким образом, с помощью ПЦР можно различить аллели, различающиеся всего одним нуклеотидом [7].

Полиморфизм ДНК — весьма распространенное явление, поэтому очень важно знать, в каких случаях он имеет место и в какой



Тип	Амплимер	Зонд	Примеры
1.	«Консервативный» (A, C)	«Консервативный» (B)	Большинство последовательностей-мишеней человека
2.	«Консервативный» (D, F)	Аллель-специфичный (E, e)	Многоаллельные мишени (серповидноклеточная анемия)
3.	Вариабельный (G, I, g, i)	Типоспецифичный (H, h)	Типирование вирусов
4.	«Консервативный» (J, L)	«Консервативный» (K)	VNTR ¹⁾ -амплификация для идентификации личности

¹⁾ VNTR — варьирующее число tandemных повторов

Рис. 15.2. Основные типы амплимеров и зондов.

степени. Предсказать полиморфизм у микроорганизмов невозможно, его можно выявить, только исследовав множество изолятов. Полиморфные локусы ДНК человека хорошо изучены и охарактеризованы и для их анализа можно подобрать оптимальные праймеры и гибридизационные зонды. Во многих случаях полиморфизм возникает в результате функционально значимых мутаций в половых или соматических клетках, и для выявления таких мутаций можно создать специальные праймеры и гибридизационные зонды. Анализ полиморфизма может использоваться также для идентификации личности (ПЦР-отпечаток пальцев [8]).

Что касается микроорганизмов, то данных об их полиморфизме гораздо меньше, и результаты ПЦР-тестов могут оказаться ложноотрицательными. В этом случае полиморфизм может отражать аллельные различия между изолятами или возникать в результате нестабильности генома (например, у ретровирусов). В связи с ограниченностью данных о структуре генома микроорганизмов приходится определять специфичность набора праймеров и зондов экспериментально. Идеальный набор праймеров должен

выявлять все изоляты исследуемого вида, но не близкородственные и различающиеся с медицинской точки зрения виды. Например, если разработанная комбинация праймеров и зондов специфична для одного из видов герпесвирусов, то она не должна «замечать» другие виды этого вируса, обеспечивая при этом амплификацию генетического материала всех изолятов исследуемого вида вируса. Поскольку даже у изолятов последовательности-мишени могут слегка различаться, для их идентификации используют два набора зондов и праймеров, специфичных к двум разным мишеням. Это гарантирует успех ПЦР-теста, поскольку одновременный полиморфизм по двум мишеням в пределах одного изолята маловероятен.

В работе [9] (см. также гл. 17) описана методика обнаружения вирусов папилломы человека (HPV), в которой для типирования используются как консервативные, так и полиморфные участки генома. При этом с помощью праймеров, специфичных в отношении консервативных участков, амплифицируют ДНК большого числа изолятов, а с помощью направленных на полиморфные последовательности типоспецифичных зондов различают изоляты (тип 2 на рис. 15.2). Можно также использовать разные наборы праймеров и зондов, специфичные к полиморфным участкам генома, и амплифицировать и типировать разные последовательности-мишени (тип 3 на рис. 15.2).

Для повышения чувствительности и специфичности можно использовать также «гнездовые» праймеры. При этом в роли матрицы выступает небольшая часть ДНК, амплифицированной в ходе первой ПЦР-реакции, а во второй ПЦР-реакции применяются праймеры, расположенные между «первыми» последовательностями-мишенями. Однако «гнездовые» праймеры не очень пригодны для рутинных клинических анализов, поскольку манипуляции с ПЦР-амплифицированной ДНК перед второй амплификацией повышают вероятность ее загрязнения.

2.2. Число циклов

Чем больше число ПЦР-циклов, тем выше чувствительность метода. Однако максимальной чувствительности нельзя достичь только таким путем, необходимо оптимизировать и другие параметры, с тем чтобы повысить эффективность каждого цикла. Число циклов амплификации зависит также от содержания в образце нужной последовательности. Если ставится цель выявления уникальных генов, присутствующих в каждой клетке (например, при ПЦР-диа-

гностике наследственных заболеваний), то достаточно 20–30 циклов, если же последовательность-мишень имеется только в части клеток исследуемого препарата (например, в случае вирусной инфекции или в опухолях), то число циклов может составлять 30–50.

2.3. Точность

Для проведения ПЦР-тестов обычно используют ДНК-полимеразу, выделенную из *Thermus aquaticus*. У этого фермента отсутствует корректирующая 3' → 5'-активность и частота ошибок при считывании достигает 1/10 000 нуклеотидов. Этой точности (хотя она и ниже, чем у многих других полимераз) достаточно для того, чтобы возникающие при репликации последовательности-мишени ошибки не создавали особых проблем.

3. Работа с образцами тканей

Образцы тканей, получаемые при хирургических операциях, обычно фиксируют формалином и заливают в парафин. Такие фиксированные препараты могут использоваться для проведения ПЦР в тех случаях, когда необходимо провести дополнительные анализы помимо обычных гистологических исследований. В этом разделе мы остановимся в основном на применении ПЦР для анализа таких препаратов.

3.1. Нативные ткани

Оптимальной матрицей для ПЦР является ДНК, выделенная из нативных тканей обычными методами. Эффективность амплификации такой ДНК обычно выше, чем ДНК, выделенной из фиксированных тканей, поэтому сравнивать результаты, полученные в этих двух случаях, следует с осторожностью.

3.2. Фиксированные ткани

3.2.1. Фиксирующие вещества

Ткани лучше всего фиксировать сразу после их получения, однако этот момент не является ключевым. Можно проводить амплификацию ДНК и в том случае, если ткани получены через семь (а возможно, и более) дней после смерти. Отличной матрицей для ПЦР является ДНК тканей, фиксированных в 10% забуференном формалине и залитых в парафиновые блоки [10, 11]. Более того, при осторожном выделении ДНК из таких фиксированных тканей

можно получить молекулы, имеющие достаточную длину для проведения Саузерн-гибридизации ([12, 13]; гл. 21). Вполне пригодным для ПЦР материалом являются ткани, фиксированные в этаноле или ацетоне и залитые в парафин. Несколько худшие результаты получаются при фиксации тканей фиксаторами Кларка и Замбони, параформальдегидом, формалином/этанолом/уксусной кислотой, метакарном и совсем непригодны фиксаторы Зенкера, Карнуа, Буэна, В-5. Более полную информацию о способах фиксации, пригодных для дальнейшего проведения ПЦР, можно найти в работе [14]. Обработка препаратов кислыми растворами, декальцифицирующими костную ткань, обычно приводит к деградации ДНК и тем самым препятствует амплификации.

3.2.2. Длительность фиксации

Длительная (более 3 сут) фиксация ткани в 10% забуференном формалине недопустима. Оптимальное время фиксации перед ее дальнейшей обработкой составляет от 1 до 24 ч. Следует учесть также, что в большинстве случаев при такой обработке происходит дополнительная фиксация в 10% формалине.

Под действием формальдегида в ДНК образуются шиффовы основания; в водных растворах эта реакция обратима. При увеличении времени фиксации начинаются другие, необратимые процессы. После заливки ткани в парафин стабильность ДНК повышается, но медленная ее деградация все-таки происходит, и в очень старых (более 10 лет) парафиновых блоках эффективность амплификации может быть меньше, чем в свежеприготовленных. Тем не менее в большинстве случаев с помощью ПЦР удается анализировать и 30-летние парафинизированные препараты [15], а иногда даже археологические образцы.

3.2.3. Изготовление срезов

Срез ткани помещают в стерильную микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл так, чтобы исключить загрязнение его посторонней тканью. Толщина среза составляет 5–10 мкм, площадь варьирует от 1 мм² до 1–3 см². Работать можно как в резиновых перчатках, так и без них. Мы в своей лаборатории перчатки не используем, поскольку в них очень трудно выполнять тонкие операции, а просто тщательно моем руки. Для манипуляций со срезами можно также использовать фильтровальную бумагу. В препарат может попасть незначительное количество клеток с пальцев исследователя, что необходимо учитывать при интерпретации результатов. Нежелательно, чтобы изготовлением срезов занимался человек с кожны-

ми заболеваниями (например, паракератозом), бородавками (если нужно выявить вирусы папилломы) и т. д. Более серьезную проблему составляет перекрестное загрязнение образцов тканей. Чтобы избежать этого, необходимо автоклавировать (в течение примерно 20 мин) и тщательно маркировать микроцентрифужные пробирки. Микротом нужно очистить от следов парафина и тканей, а нож перед получением очередного среза осторожно протереть фильтровальной бумагой. Менять ножи или протирать их кислотами или ксилолом обычно не требуется, достаточная очистка происходит при подравнивании блока перед получением среза. Для проверки чистоты препаратов нужно поочередно делать срезы тканей, представляющих собой положительный и отрицательный контроли.

Лишний парафин с блоков обычно не удаляют. Микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл, куда помещают срезы, должны быть сухими, поскольку вода мешает депарафинированию. Если срезы очень маленькие, их лучше сразу поместить в пробирку, где будет проводиться ПЦР (микроцентрифужная пробирка на 0,5 мл). Полученные срезы можно хранить в течение месяцев при комнатной температуре.

Большинство тканей являются хорошими субстратами для ПЦР. Иногда возникают проблемы при анализе таких тканей, как мозг или селезенка, но особенно трудно работать с препаратами, сильно загрязненными кровью, и с некротизированными тканями.

3.2.4. Выделение ДНК из срезов

Парафин из срезов удаляют обычными методами (протокол 15.1). В зависимости от размера среза для выделения ДНК используют два основных метода, которые описаны в протоколах 15.2 (выделение ДНК из небольших количеств ткани) и 15.3 (выделение ДНК из срезов большого размера). В табл. 15.2 даны рекомендации по выбору метода выделения. Альтернативный способ с применением детергентов предложен в работе [17].

Протокол 15.1. Депарафинирование срезов

Срезы можно депарафинировать с помощью ксилола или октана.

1. В микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл, куда помещен срез, добавляют примерно 1 мл выбранного растворителя, встряхивают и оставляют при комнатной температуре примерно на 2 мин. Парафин при этом должен полностью раствориться.
2. Собирают ткань центрифугированием при 12 000 g в течение 5 мин.

3. Сливают супернатант (осадок при этом может быть едва заметен).
4. Добавляют в пробирку 1 мл 95–100% этанола и встряхивают (ткань при этом должна приобрести беловатый цвет).
5. Центрифугируют при 12 000 g в течение 5 мин и сливают супернатант.
6. Этапы 4 и 5 повторяют еще раз (необходимо дважды промыть ткань этанолом).
7. Высушивают ткань в эксикаторе или вакуумном концентраторе в течение 30 или более минут.
8. Высушенную ткань можно хранить при комнатной температуре в течение нескольких недель.

Таблица 15.2. Рекомендации по выбору метода выделения ДНК

Площадь среза	Число срезов	Метод выделения
< 1 мм ² (очень маленькие биоптаты или клеточные блоки, полученные из тонкоигольных аспиратов)	1–3	Протокол 15.2
1–2 мм ² (маленькие биоптаты)	1–3	Протоколы 15.2 и 15.3
> 2 мм ² (большинство тканей)	1	Протокол 15.3

Протокол 15.2. Выделение ДНК из небольших срезов (см. табл. 15.2)

При работе с очень небольшими срезами амплификацию необходимо провести сразу после депарафинирования¹⁾.

1. Добавляют 50 мкл стерильной дистиллированной воды к высушенному препарату, подготовленному так, как это описано в протоколе 15.1.
2. Микроцентрифужную пробирку плотно закрывают и на 7 мин помещают в кипящую водяную баню, затем охлаждают ее во льду.
3. Добавляют 50 мкл амплификационной смеси²⁾ и измельчают ткань кончиком микропипетки, с тем чтобы обеспечить доступ к ДНК реактивов, входящих в состав смеси. Остатки ткани в микроцентрифужной пробирке при этом остаются видимыми.
4. Проводят амплификацию в термоциклере (см. протокол 15.4).

¹⁾ Парафиновые срезы лучше сразу помещать в микроцентрифужные пробирки на 0,5 мл, поскольку переносить фрагменты ткани после депарафинизации трудно.

²⁾ Состав смеси приведен в протоколе 15.4.

Протокол 15.3. Выделение ДНК из больших срезов (см. табл. 15.2)*Материалы*

- Буфер для выделения: 100 мМ трис-НСl, 1 мМ ЭДТА, pH 8,0
- Протеиназа К: 20 мг/мл в стерильной дистиллированной воде

Методика

1. Добавляют 50 мкл буфера для выделения¹⁾ к высушенному препарату, подготовленному так, как это описано в протоколе 15.1.
2. Добавляют 1 мкл раствора протеиназы К.
3. Измельчают ткань кончиком микропипетки, с тем чтобы обеспечить доступ реактивов к ткани, и инкубируют ее при 37 °С в течение ночи или при 50 °С в течение 3 ч.
4. Встряхивают образец в течение 30 с на вортексе и кипятят его для инактивации протеиназы К в течение 7 мин.
5. Остатки ткани собирают центрифугированием при 12 000 g в течение 5 мин и отбирают супернатант, который в дальнейшем используют для проведения ПЦР²⁾.

¹⁾ Объем подбирают в соответствии с размером среза так, чтобы конечная концентрация протеиназы К была равна 400 мкг/мл.

²⁾ Выделенную этим методом ДНК можно хранить в течение нескольких месяцев при -20 °С или при 4 °С.

3.2.5. ПЦР

Если образец ткани очень маленький, лучше амплифицировать всю полученную из него ДНК (см. протокол 15.2). В случае срезов большого размера для амплификации достаточно 1/10–1/50 материала. В некоторых случаях амплификация ингибируется самой выделенной ДНК (или какими-то другими компонентами, присутствующими в буфере для выделения), и лучшие результаты получаются при меньшем количестве материала. Количество выделенной ДНК и степень ее деградации можно определить, проведя электрофорез 5–10 мкл раствора ДНК, полученной в соответствии с протоколом 15.3, в 0,7% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Очень важным при анализе фиксированных тканей является размер последовательности-мишени. Обычно небольшие фрагменты детектировать проще. Лучше, чтобы их размер не превышал 200 п.н., а оптимальной является длина ≤ 100 п.н., в этом случае амплификация практически всегда проходит успешно.

В ходе ПЦР образцы инкубируют при трех разных температурах, соответствующих трем этапам цикла: денатурации мишени (90–95 °C), отжигу (40–60 °C) и удлинению праймера (72 °C). При проведении амплификации вручную оборудование может быть очень простым: несколько водяных бань с разной температурой. В последнее время широко используют автоматические приборы с микропроцессорным управлением; их выпускают такие фирмы, как Perkin–Elmer Cetus Instruments, Techne, Koch-Light.

В протоколе 15.4 дано описание типичной ПЦР-реакции. Исходную реакционную смесь, приготовленную так, как это описано в п. 1, разливают по пробиркам, в которых будет проводиться амплификация, и добавляют ДНК-мишень в последнюю очередь. Объем реакционной смеси не очень критичен (достаточно точности ~ 10%), так что корректировать состав реакционной смеси в зависимости от разного количества добавленной ДНК-матрицы не нужно. Детали процесса амплификации, приведенные в п. 4, следует рассматривать как ориентировочные, но температура денатурации 94–95 °C приемлема для всех мишеней. Более длительный начальный прогрев (5 мин при 95 °C) обеспечивает полную денатурацию всех молекул ДНК в образце, и последующая денатурация в каждом цикле амплификации будет занимать меньше времени (45–60 с). Частой причиной неудачи является недостаточное нагревание образцов на этапе денатурации. Температура отжига определяет жесткость условий гибридизации праймеров с мишенью и, следовательно, специфичность амплификации; она зависит от длины праймеров и их GC-содержания. Эту температуру можно оценить по формуле

$$4^{\circ}\text{C} \cdot (\text{G} + \text{C}) + 2^{\circ}\text{C} \cdot (\text{A} + \text{T}) - 3.$$

На практике температуру отжига необходимо подбирать опытным путем, используя положительные и отрицательные контроли; она находится в диапазоне 37–65 °C.

Температура на этапе элонгации должна составлять 72 °C, именно при таких условиях ДНК-полимераза *Taq* обладает оптимальной активностью. Необходимое время элонгации определяется размером продуктов амплификации; считается, что копирование каждой 1000 п.н. занимает 1 мин. Таким образом, в случае архивных препаратов с размером мишени 100–200 п.н. время элонгации обычно составляет 40–60 с.

Протокол 15.4. Полимеразная цепная реакция¹⁾

Материалы

- 10 × буфер: 100 мМ трис-НCl, pH 8,3, 500 мМ KCl, 25 мМ MgCl₂
- 10 × dNTP: по 2 мМ dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- Праймеры: 20—100 пмоль каждого праймера на реакцию
- *Taq*-полимераза
- ДНК, выделенная в соответствии с протоколами 15.2 или 15.3
- Минеральное масло

Методика

1. Готовят смесь следующего состава:

- | | |
|--------------------------|------------------------------------|
| • 10 × буфер | 10 мкл |
| • 10 × dNTP | 10 мкл |
| • Праймеры | до конечной концентрации 0,2–1 мкМ |
| • <i>Taq</i> -полимераза | 0,4 мкл (2 ЕД) ²⁾ |

2. Добавляют ДНК-матрицу и доводят объем реакционной смеси дистиллированной водой до 100 мкл³⁾.

3. На водную фазу наслаивают 1–2 капли минерального масла.

4. Помещают пробирки в прибор для амплификации, запрограммированный на определенный режим работы. Типичный ПЦР-цикл может быть таким: начальный прогрев при 94 °С в течение 5 мин; 20–50 циклов, состоящих из этапов денатурации (95 °С в течение 45 с), отжига (50 °С в течение 45 с), элонгации (72 °С в течение 60 с) (см. текст).

¹⁾ Оптимальные условия проведения реакции для каждой комбинации праймеров и ДНК-мишени необходимо подбирать опытным путем с использованием положительных и отрицательных контролей, изменяя концентрации ионов магния, dNTP, праймеров. Концентрации, указанные в протоколе, могут служить при таком подборе ориентиром.

²⁾ Если амплификация ингибируется ДНК-матрицей, то количество ДНК-полимеразы *Taq* можно увеличить (до 4 и более единиц).

³⁾ Для экономии реактивов можно проводить амплификацию в 50 мкл реакционной смеси, соответственно уменьшив количество всех компонентов.

3.3. Спинномозговая жидкость (СМЖ)

Небольшой объем доступной для анализа спинномозговой жидкости не позволяет выделить из нее ДНК в количестве, достаточном для применения обычных молекулярно-генетических методов. Но, по нашим данным и данным других исследователей [18, 19], не содержащий крови препарат СМЖ можно исследовать, прокипя-

тив его сразу после получения от больного. Такой препарат объемом до 50 мкл добавляют в реакционную смесь объемом 100 мкл. Соответствующая процедура описана в протоколе 15.5.

Протокол 15.5. ПЦР-анализ клеток СМЖ¹⁾

1. Определяют число присутствующих в образце лейкоцитов (например, при концентрации 10 клеток/мкл)²⁾.
2. 1 мл СМЖ разливают в стерильные пробирки на 0,5 мл, где будет проводиться ПЦР:

<i>Объем СМЖ, мкл</i>	<i>Объем воды, мкл</i>	<i>Число клеток (при концентрации 10 клеток/мкл)</i>
10	40	100
50	0	500
200 ³⁾	0	2000
750 ³⁾	0	7500

3. Для разрушения клеток кипятят пробы в течение 5–10 мин.
4. Добавляют реакционную смесь для проведения ПЦР и осуществляют амплификацию в соответствии с тем, как это описано в протоколе 15.4.

¹⁾ С помощью ПЦР можно выявлять в СМЖ внеклеточные микроорганизмы (предварительно осадив их центрифугированием) (см. также гл. 19 и работу [20]).

²⁾ Максимальное число грубо очищенных клеток, которое можно амплифицировать, равно примерно 100 000.

³⁾ Для этих разведений клетки осаждают центрифугированием на клинической центрифуге, супернатант удаляют и клетки ресуспендируют в объеме 50 мкл. Эту суспензию и используют для проведения ПЦР.

3.4. Ткани, замороженные в среде, обеспечивающей оптимальные условия резания при данной температуре (ОСТ)

Часто образцы тканей замораживают в специальных средах (таких, как ОСТ), облегчающих получение срезов. Имея всего один замороженный срез толщиной 10 мкм, можно легко и быстро провести ПЦР, сохранив большую часть образца для дальнейших исследований (см. протокол 15.6). Эффективность ПЦР, в которой матрицей служит ДНК из замороженных срезов, обычно выше, чем для ДНК из фиксированных срезов.

Протокол 15.6. Обработка криостатных срезов

1. В стерильную пробирку помещают один криостатный срез толщиной 10 мкм.
2. Добавляют немного 0,9% (в/о) NaCl, быстро перемешивают, собирают ткань центрифугированием при 12 000 g в течение 5 мин и удаляют по возможности весь супернатант.
3. Фиксируют ткань в течение 5–10 мин в 95% этаноле.
4. Осаждают ткань центрифугированием при 12 000 g в течение 5 мин и высушивают ее.
5. Выделяют ДНК таким же образом, как из залитых в парафин тканей (см. протокол 15.3), и проводят амплификацию (см. протокол 15.4).

3.5. Архивные препараты

Чтобы амплифицировать ДНК из окрашенных архивных препаратов или из мазков, окрашенных по методу Папаниколау, препараты соскребают с предметных стекол и обрабатывают их так же, как высушенную депарафинированную ткань (протокол 15.4). При этом образуется большое число фрагментов ткани, что существенно повышает вероятность перекрестного загрязнения препаратов и требует особой аккуратности в работе.

3.6. ПЦР in situ

Весьма перспективным представляется объединение ПЦР и гибридизации in situ. О первых результатах, полученных с помощью этого высокочувствительного метода идентификации клеток, содержащих интересующую исследователя последовательность, сообщалось в работе [22].

4. Анализ ПЦР-амплифицированной ДНК

Для анализа ПЦР-амплифицированной ДНК используют разные методы. Мы рассмотрим три наиболее простых: гель-электрофорез, дот-блот-гибридизацию и блот-гибридизацию по Саузерну (см. также гл. 12, 14, 17). С их помощью можно анализировать большинство ПЦР-продуктов, но абсолютно точные результаты можно получить только секвенированием (гл. 16).

4.1. Подготовка ПЦР-продуктов

Прежде всего необходимо удалить покрывавшее реакционную смесь минеральное масло. Для этого в пробирку для ПЦР добав-

ляют несколько капель хлороформа, пробирку встряхивают и центрифугируют при 12 000 g в течение 1 мин, чтобы отделить водную фазу, содержащую ПЦР-продукты. Амплифицированную ДНК можно хранить с хлороформом при 4 °C в течение нескольких недель. Для последующего анализа обычно берут от 1/10 до 1/5 объема реакционной смеси.

4.2. Гель-электрофорез

Электрофорез в агарозном геле позволяет легко, без применения радиоизотопов, обнаружить амплифицированную ДНК и определить ее размер. Процедура электрофореза в агарозном геле описана в гл. 12. Остановимся на некоторых ее особенностях применительно к анализу ПЦР-амплифицированной ДНК.

- а. 10–20 мкл амплифицированной ДНК разделяют в 2% агарозном геле вместе со стандартными фрагментами размером 50–1000 п.н.
- б. Электрофорез проводят при высоком напряжении (~10–15 В/см), поскольку образующиеся при ПЦР небольшие фрагменты сложно детектировать после электрофореза в течение ночи при небольшом напряжении вследствие их интенсивной диффузии. Разрешение можно повысить, используя полиакриламидные (гл. 17) или агарозные гели NuSieve (FMC Bio-Products, Rockland, USA) с высокой концентрацией агарозы (3–4%). Впрочем, если анализ нужно провести быстро и при небольших затратах, вполне приемлемы 2% агарозные гели.

Обычно при амплификации ДНК, выделенной из фиксированных тканей, выход ПЦР-продуктов ниже и они менее специфичны, чем в случае амплификации высокоочищенной ДНК. При электрофорезе в агарозном геле наблюдается большое число полос или размазанное пятно, и чтобы повысить чувствительность и специфичность, применяют описанные в разд. 4.3 и 4.4 гибридизационные методы.

4.3. Гибридизация ПЦР-амплифицированной ДНК по Саузерну

Этот метод позволяет идентифицировать полосы в геле, наблюдаемые после электрофореза амплифицированной ДНК. Для гибридизации используются как изотопно, так и неизотопно меченные зонды. Подробно метод гибридизации ПЦР-продуктов описан в протоколе 15.7.

4.4. Дот-блот-гибридизация ПЦР-амплифицированной ДНК

Дот-блот-гибридизация дает простой ответ по типу да—нет и особенно полезна в тех случаях, когда проводится анализ большого числа образцов. Один из примеров применения этого метода описан в протоколе 15.8, а более детальную информацию можно найти в гл. 14.

Протокол 15.7. Гибридизация ПЦР-амплифицированный ДНК по Саузерну¹⁾

Материалы

- Буфер для денатурации: 1,5 М NaOH, 0,5 М NaCl
- Буфер для нейтрализации: 1,5 М трис-HCl, 0,5 М NaCl, pH 6,5
- 20× SSPE: 3,6 М NaCl, 0,2 М фосфат натрия, 0,02 М ЭДТА, pH 7,4
- 10% (в/о) ДСН

Методика

1. Для денатурации фрагментов ДНК гель вымачивают в буфере для денатурации при осторожном покачивании в течение 30 мин при комнатной температуре, затем выдерживают в буфере для нейтрализации в течение 30 мин.
2. За это время вымачивают нейлоновый фильтр для переноса ДНК в 6× SSPE в течение 5 мин (или дольше). Мы используем фильтры Genetrans 45 (Plasco, Wolburn, Massachusetts, USA).
3. Собирают систему для переноса ДНК, как показано на рис. 14.1, и проводят перенос при комнатной температуре в течение ночи. В качестве буфера для переноса используют 20× SSPE.
4. По окончании переноса снимают фильтровальную бумагу и отмечают положение лунок на фильтре. Фильтр снимают и для удаления прилипшей агарозы промывают в 20× SSPE в течение 1 мин.
5. Пришивают ДНК к фильтру, поместив последний (стороной с ДНК вверх) на 5 мин под УФ-лампу (254 нм). Можно воспользоваться и специальным прибором для пришивания ДНК (Stratagene, La Jolla, California, USA).
6. Помещают фильтр в полиэтиленовый пакет и запаивают его²⁾. Проводят предгибридизацию при 42 °С в течение 10 мин и гибридизацию с соответствующим меченым зондом (гл. 13) при той же температуре в течение 30–60 мин (гл. 14). В качестве зонда обычно используют 5'-меченные с помощью полинуклеотидкиназы олигонуклеотиды.

7. Промывают фильтр в двух-трех сменах $2 \times \text{SSPE}$, 0,1% ДСН, по 5 мин в каждой смене. Иногда на этом этапе проводят отмывание и в более жестких условиях, но необходимость этой процедуры определяют опытным путем³⁾.
8. Гибридизовавшийся зонд выявляют с помощью радиоавтографии или неизотопными методами детекции (гл. 14).

¹⁾ Более подробно об этом см. в гл. 14.

²⁾ Подготовленные таким образом фильтры можно хранить при комнатной температуре в течение нескольких недель.

³⁾ Жесткость условий можно повысить, увеличив содержание формамида, уменьшив концентрацию соли или повысив температуру отмывания. Обычно используют следующие условия: $0,1 \times \text{SSPE}$, 65 °C; 50% формамид, $2 \times \text{SSPE}$, 37–42 °C.

Протокол 15.8. Дот-блот-гибридизация ПЦР-амплифицированной ДНК

Материалы

- Раствор для денатурации: 0,4 М NaOH, 1 мМ ЭДТА
- $20 \times \text{SSPE}$ (см. протокол 15.7)
- Найлоновый фильтр
- Прибор для получения дот-блотов¹⁾

Методика

1. Вымачивают найлоновый фильтр в дистиллированной воде не менее 5 мин.
2. 10–20 мкл ПЦР-амплифицированной ДНК добавляют к 300 мкл раствора для денатурации (денатурация при этом происходит практически мгновенно).
3. Каждый образец вносят в отдельную ячейку прибора для получения дот-блотов; следят за тем, чтобы для всасывания образца из ячейки требовалось около 1 мин¹⁾.
4. Промывают каждую ячейку $20 \times \text{SSPE}$ три раза по 5 мин.
5. Вынимают фильтр из прибора и ополаскивают его в $20 \times \text{SSPE}$.
6. Выполняют операции, описанные в протоколе 15.7, начиная с п. 5.

¹⁾ Образцы можно нанести на фильтры вручную (см. гл. 14).

5. Интерпретация результатов

Результат ПЦР можно квалифицировать как положительный или отрицательный в зависимости от того, обнаружена в образце

интересующая нас последовательность-мишень или нет. Однако нарушение нормального хода амплификации, недостаточная чувствительность метода и непредвиденный полиморфизм последовательности-мишени в области связывания праймеров или гибридизационного зонда может дать ложноотрицательный результат. В случае загрязнения образцов и случайной гомологии между зондом, праймерами и последовательностью, сходной с мишенью, получаются ложноположительные результаты. Проблемы, которые возникают в связи с перекрестными реакциями с участием зонда или праймеров и возможным полиморфизмом, рассмотрены в разд. 2.1.2.

5.1. Выбор контролей

Очень важным для правильной интерпретации результатов является выбор контролей. Положительные и отрицательные контроли должны быть хорошо охарактеризованы. Часто используют ДНК из клеточных линий, заведомо содержащих или не содержащих последовательность-мишень. В каждом анализе нужны как минимум три контроля:

- положительный контроль;
- отрицательный контроль;
- бланк-контроль.

Бланк-контроль — это реакционная смесь, в которой присутствуют все компоненты, за исключением ДНК; он является индикатором загрязнений. Один тип положительного контроля должен содержать максимальное число последовательностей-мишеней, другой — небольшое их число. Это позволяет определить чувствительность и эффективность ПЦР.

В некоторых случаях амплификация вообще не идет, и если есть основания думать, что полученный результат ложноотрицательный, очень трудно определить, по какой именно причине. Чтобы решить эту проблему, каждый образец необходимо тестировать, проводя амплификацию какой-нибудь геномной последовательности, например гена рецептора липопротеинов низкой плотности или β -глобинового гена (детали такого тестирования рассмотрены в гл. 17). При этом размер геномной последовательности-мишени должен быть немного больше, чем исследуемой; это позволит убедиться, что ДНК образца не слишком сильно деградирована. При ПЦР любого образца тканей человека геномная ДНК должна амплифицироваться. Отсутствие амплификации может означать ингибирование фермента, сильную деградацию ДНК или то, что ее

Таблица 15.3. Контроль загрязнений при проведении ПЦР

Пробирка	Образец	Мишень	Геномная ДНК	Интерпретация
1	Ткань 1	+	+	Ткань содержит мишень
2	Ткань 2	—	+	Ткань не содержит мишени
3	Ткань 3	—	—	Результат неинформативен, анализ повторить
4 ¹⁾	Ткань 4	+	—	Загрязнение? Анализ повторить
5 ²⁾	Положительный контроль	+	+	Система работает нормально
6 ³⁾	Отрицательный контроль	—	+	То же
7 ⁴⁾	Бланк-контроль	—	—	То же

¹⁾ Если загрязнение исключено, то ткань, возможно, содержит последовательность-мишень. Это может быть, если мишень короче и присутствует в большем количестве, чем геномная последовательность.

²⁾ Обычно это ДНК, выделенная из заведомо позитивных клеток.

³⁾ Обычно это ДНК, выделенная из заведомо негативных клеток.

⁴⁾ Все компоненты, за исключением ДНК. Это позволяет убедиться в том, что буферы, нуклеотиды, праймеры и т. д. не загрязнены.

слишком мало. В этом случае надо повторить амплификацию образца, увеличив и уменьшив количество ДНК-матрицы или увеличив концентрацию ДНК-полимеразы *Taq*. Амплификация может отсутствовать несмотря на все предпринятые усилия. Это может быть связано с сильным некрозом исследуемой ткани или фиксацией препарата не в 10% формалине, а в других фиксаторах. В этом случае единственным выходом является повторная биопсия.

Геномные праймеры можно использовать в одном раунде ПЦР вместе с праймерами, специфичными в отношении последовательности-мишени: амплификация двух последовательностей идет при этом одновременно (см. протокол 15.4 и гл. 17). Такой множественный ПЦР-тест может быть менее чувствительным, чем тот, в котором используется один набор праймеров, но он исключает появление ложноотрицательного результата. Типичная схема проведения ПЦР-анализа и интерпретации его результатов даны в табл. 15.3.

5.2. Чувствительность

Определить чувствительность ПЦР-метода применительно к анализу фиксированных и залитых в парафин препаратов достаточно сложно. Это связано с отсутствием хорошо охарактеризованных нативных тканей с известным содержанием последова-

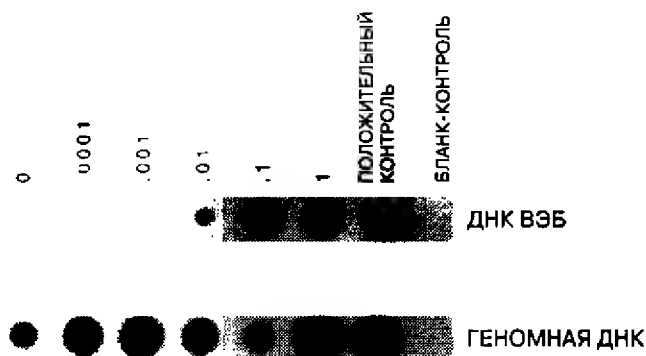


Рис. 15.3. Чувствительность ПЦР-анализа, проведенного на фиксированных формалином и залитых в парафин тканях. Смесь клеток Raji (при мерно 50 копий ДНК EBV на клетку) и Molt 3 (не содержат EBV) собира- ли центрифугированием, фиксировали в 10% забуференном формалине в течение 1 ч и заливали в парафиновые блоки. Делали срезы толщиной 10 мкм, содержащие примерно по 1000 клеток, обрабатывали их, как опи- сано в протоколах 15.1 и 15.2, и проводили ПЦР-анализ с использовани- ем геномных и EBV-специфичных праймеров. Продукты амплификации анализировали с помощью дот-блот-гибридизации с геномным и EBV-специфичным зондами. Как и следовало ожидать, гибридизация с геном- ным зондом происходила во всех клеточных смесях, а с EBV-специфич- ным наблюдалась только в смеси, в которой доля клеток линии Raji составляла 0,01, но не 0,001 или 0,0001. Таким образом, при тех условиях, в которых проводилась ПЦР, удастся выявить примерно 10 EBV-инфи- цированных клеток на 1000 нормальных (число клеток, с которым прово- дился ПЦР-анализ). Повысить чувствительность можно, изменив усло- вия проведения ПЦР или используя для анализа большее число клеток.

тельности-мишени, а чувствительность метода при анализе очи- щенной ДНК и ДНК, полученной из фиксированных формали- ном тканей, при одних и тех же условиях заметно различается.

Однако в настоящее время есть возможность создавать искусст- венные фиксированные ткани с известным содержанием последо- вательности-мишени на основе хорошо охарактеризованных кле- точных линий. Для этого смешивают клетки, содержащие нужную последовательность и не содержащие ее, смесь фиксируют в фор- малине и заливают в парафин. Полученный блок нарезают и обра- батывают так же, как биоптаты тканей (см. протоколы 15.1–15.4), проводят ПЦР и определяют чувствительность метода (рис. 15.3). И хотя этот прием не позволяет определить чувствительность ПЦР- метода с такой высокой точностью, как этого хотелось бы (см. ни- же), он указывает путь к правильной интерпретации результатов.

5.3. Количественный ПЦР-анализ

Логично думать, что количество образующейся при ПЦР ДНК коррелирует с числом последовательностей-мишеней в анализируемом образце. Однако так бывает не всегда. Часто такие исключения наблюдаются при работе с препаратами тканей, залитыми в парафин: в этом случае число факторов, влияющих на эффективность амплификации, особенно велико. Это могут быть природа ткани, способ фиксации и ее продолжительность, время, прошедшее от момента получения ткани до ее фиксации, «возраст» парафиновых блоков, размер среза, количество выделенной и использованной для ПЦР ДНК.

Часто клинические образцы получают в условиях, далеких от оптимальных, что тоже затрудняет проведение количественного анализа, особенно определение абсолютного количества последо-

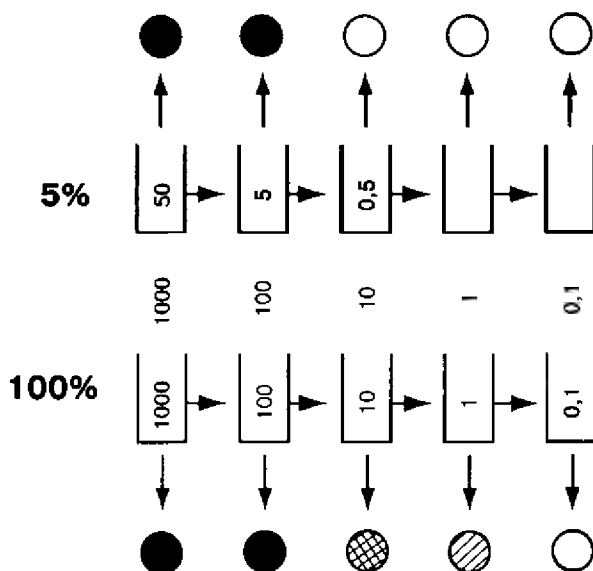


Рис. 15.4. Оценка количества последовательностей-мишеней. Готовят последовательные десятикратные разведения исходного препарата ДНК (для этого берут 1 мкл исходной ДНК и разбавляют его в пробирке для ПЦР 10 мкл воды; повторяют эту операцию несколько раз). К каждому разведению (10 мкл) добавляют реакционную смесь и проводят амплификацию. При этом чем меньше в исходном препарате ДНК последовательностей-мишеней, тем раньше (т. е. при меньших разведениях) прекращается амплификация.

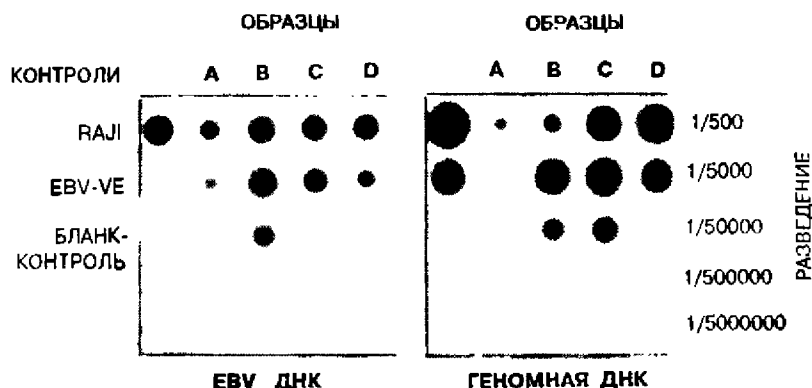


Рис. 15.5. Относительное содержание последовательности-мишени, определенное методом разведений. ДНК, выделенные из образцов А–D (см. протокол 15.3), разбавляли (рис. 15.4) и амплифицировали с использованием геномных и EBV-специфичных праймеров. Разведение 1/500 означает, что в реакционной смеси находится 0,1 мкл из тех 50 мкл ДНК, которые получены в соответствии с протоколом 15.3. ПЦР-амплифицированную ДНК анализировали с помощью дот-блот-гибридизации (протокол 15.8) на фильтрах, используя в качестве зондов геномную ДНК и ДНК EBV. По содержанию EBV образцы ДНК можно разделить на 3 группы. К группе 3+ можно отнести те образцы, разведения которых в смысле гибрилизации как с геномным, так и с EBV-зондами ведут себя сходным образом (А, В, D). Если гибрилизация с геномным зондом идет при больших разведениях, чем с EBV-зондом, то такие образцы (например, В) относят к категории 2+. Если с EBV-зондом гибридируется только неразведенная ДНК, то образцы относят к группе 1+. Такая классификация позволяет сравнивать фиксированные препараты тканей, различающиеся по размеру, клеточному составу и способу фиксации.

вательности-мишени. Для таких препаратов разработан простой относительный метод, основанный на ПЦР-анализе нескольких разведений препарата ДНК (рис. 15.4). Для этого готовят последовательные десятикратные разведения ДНК в воде и проводят амплификацию в условиях, позволяющих получить максимальную чувствительность; число циклов ПЦР при этом может достигать 50. Такой анализ позволяет оценить минимальное число последовательностей-мишеней в препарате, поскольку при достаточно сильном разведении амплификация должна прекратиться. Если параллельно проводить амплификацию какой-либо геномной последовательности, то можно определить соотношение между числом клеток и числом последовательностей-мишеней. Рис. 15.5 ил-

Таблица 15.4. Определение чувствительности методом разведений

Число амплифицированных клеток	Последовательность-мишень	Геномная последовательность	Интерпретация
100 000	+	+	≥ 1 мишень/100 000 клеток
10 000	+	+	≥ 1 мишень/10 000 клеток
1000	+	+	≥ 1 мишень/1000 клеток
100	+	+	≥ 1 мишень/100 клеток
10	+	+	≥ 1 мишень/10 клеток
1	+	+	Мишень практически в каждой клетке
0	—	—	Система работает нормально

Точное количество клеток в последних разведениях определить невозможно вследствие ошибок в пипетировании и пуассоновского распределения числа клеток. Геномные последовательности должны амплифицироваться и детектироваться на уровне примерно 1 клетки. В этом случае, если последовательность-мишень содержится в 1% клеток, последнее дающее положительный сигнал разведение должно соответствовать 100 клеткам.

люстрирует применение метода разведений. При известном числе клеток в препарате (например, в препарате СМЖ) интерпретацию результатов проводят так, как это описано в табл. 15.4.

6. Загрязнения

Способы предотвращения загрязнений препаратов, используемые в лабораторной практике, рассмотрены в работах [24, 25]. Очень важно хранить реактивы не целиком, а небольшими порциями, поскольку при обнаружении загрязнений приходится уничтожать все реактивы. Загрязнение может произойти в результате случайного внесения в образец посторонней последовательности-мишени. Это может случиться на любом этапе: при получении образца от больного, выделении ДНК, на стадии амплификации. Поскольку при ПЦР происходит экспоненциальное увеличение числа копий последовательности-мишени, то ложноположительный результат может получиться при минимальном количестве посторонней ДНК, вплоть до одной молекулы. Поэтому при работе необходимо соблюдать такие же строгие меры предосторожности, как и те, что используются в микробиологии.

6.1. Возможности применения ПЦР в целях клинической диагностики

Широкое применение ПЦР в клинике ограничивается возможностью загрязнения препаратов посторонними ДНК, что приводит к ложноположительным результатам. Загрязнения мож-

но разделить на случайные и повсеместные. Во втором случае положительный сигнал дает как большинство анализируемых образцов, так и отрицательный контроль. Этот тип загрязнений легко выявляется с помощью системы контролей. Случайные загрязнения гораздо более коварны, поскольку загрязненными оказываются отдельные образцы ДНК или пробирки для ПЦР. Ложноположительный результат возникает непредсказуемым образом и распознается с большим трудом.

6.2. Лабораторная практика

Предупредить появление случайных ложноположительных результатов помогает оснащение лаборатории соответствующим оборудованием и хорошая организация работы. Чтобы выявить загрязнение, можно провести двух- или трехкратный анализ каждого образца, и если во всех случаях результат будет положительным, то его можно считать истинным. Кроме того, если это возможно, следует провести ПЦР-амплификацию нескольких последовательностей-мишеней: вряд ли посторонняя ДНК будет сходна сразу с несколькими из них. Наконец, можно еще раз получить от больного образец ткани и провести его повторный анализ. Конечно, это требует дополнительного времени и отрицательно сказывается на таком важном преимуществе ПЦР, как быстрота. Обычно, если работа в лаборатории организована хорошо, повторные анализы приходится проводить очень редко — только тогда, когда получаемый результат особенно важен.

Другой метод выявления случайных загрязнений основан на амплификации полиморфных последовательностей-мишеней (см. разд. 2.1.2); такими последовательностями могут быть VNTR, рестрикционные сайты и точковые полиморфные сайты [26, 27]. Если, по данным ПЦР, один и тот же полиморфный вариант встречается в анализируемой группе образцов слишком часто, то это указывает на наличие загрязнения.

Обычно в лабораторной практике происходят загрязнения двух типов: перекрестные загрязнения разных препаратов (их можно исключить, организовав должным образом работу) и загрязнения продуктами амплификации. Последнее гораздо более опасно, поскольку в каждой пробирке содержится огромное число фрагментов амплифицированной ДНК, и каждый из них может стать источником загрязнения. Например, в реакционной смеси объемом 100 мкл может содержаться до 10^9 копий последовательности-мишени, и если содержимое такой пробирки случайно по-

падет в 100 л воды, то каждый ее микролитр будет содержать 10 копий легко амплифицируемой последовательности-загрязнителя. Этот пример показывает, как легко загрязнить амплифицированной ДНК все, что есть в лаборатории, и как трудно устранить последствия этого загрязнения. Из всего сказанного становится ясно, что задачей первостепенной важности является упорядочение использования в лаборатории реактивов и оборудования.

Поскольку основной причиной появления ложноположительных результатов является загрязнение продуктами ПЦР-реакции, необходимо физически разделить подготовительные этапы ПЦР и этапы анализа ПЦР-амплифицированной ДНК, обеспечить однонаправленность «потока» реактивов и всех используемых материалов. Наибольшую опасность представляет та часть лаборатории, где открывают пробирки с реакционной смесью после амплификации. Ее а priori считают загрязненной, и в идеале отсюда ничего (образцы ДНК, микропипетки, центрифуги, пробирки и т. д.) не должно попадать в ту часть лаборатории, где подготавливают и проводят ПЦР. В связи с этим очень часто подготовку к ПЦР и анализ ПЦР-амплифицированной ДНК проводят в разных зданиях. В этом случае вероятность загрязнения продуктами ПЦР сводится к минимуму.

Несмотря на рекомендации работать в перчатках, мы при подготовке и проведении ПЦР их обычно не используем. Это связано с тем, что трудно подобрать перчатки по руке, а кроме того, в них сложно проводить тонкие манипуляции. К тому же при работе в перчатках создается ложное ощущение безопасности. Желательно (но не обязательно) все работы проводить в ламинарном шкафу. Чтобы уменьшить число «гуляющих» по лаборатории последовательностей-мишеней, можно также включать в лабораторных помещениях в нерабочее время УФ-лампы, испускающие коротковолновое (254–300 нм) излучение, которое приводит к образованию сшивок в молекулах ДНК и препятствует функционированию ее в качестве матрицы в ПЦР [28].

Основным источником загрязнений в лаборатории могут быть сами исследователи. Правило «однонаправленности движения» при проведении ПЦР должно выполняться и в этом случае. Не следует готовить препараты ДНК или проводить ПЦР после работы с ПЦР-амплифицированной ДНК. В идеале один человек должен заниматься подготовкой и проведением ПЦР, а другой работать с амплифицированной ДНК: на этом этапе уже не нужно соблюдать специальные меры безопасности.

Возможным источником загрязнений являются также положительные контроли, поскольку в результате их естественной ам-

плификации может образовываться сравнительно большое число мишеней (плазмид, клеток и т. д.). Все манипуляции с ними необходимо проводить в другом месте, чем то, где идет подготовка к ПЦР. Используют только то небольшое число контрольных мишеней, которое совершенно необходимо для конкретной ПЦР.

6.3. Если загрязнение уже произошло

Если загрязнение все же произошло, то необходимо устранить его источник. Если загрязнен какой-то используемый в ПЦР реактив, то лучше выбросить все реактивы, поскольку попытки найти конкретный источник загрязнения приводят к большим затратам времени и грозят распространением посторонней ДНК. Если и после смены реактивов загрязнение сохраняется, то необходимо заменить или тщательно вымыть и обработать ультрафиолетом все оборудование (эксикаторы, микропипетки, микротомы). Для выявления загрязненного оборудования или загрязненных мест в лаборатории можно исследовать смывы, сделанные в соответствующих частях помещения [29]. Необходимо также тщательно проанализировать все этапы работы.

Если все эти меры не дают результата, есть два пути. Во-первых, можно сменить последовательность-мишень, либо подобрав праймеры к другой последовательности, либо используя праймеры, которые гибридизуются с той же последовательностью-мишенью, но с внешней стороны от первой пары праймеров (обратная «гнездовая» ПЦР). Это предотвращает загрязнение ПЦР-амплифицированной ДНК. Во-вторых, можно полностью прекратить работу на несколько месяцев. Как это ни парадоксально, активные усилия по выявлению и устранению загрязнений ведут к их распространению (так называемое «ПЦР-сумасшествие» [30]), и только прекращение работ на 2–3 месяца приводит к самопроизвольному исчезновению загрязнения (по-видимому, в результате естественной деградации нуклеиновых кислот). При этом, конечно, можно продолжать работать с другими, не загрязненными последовательностями-мишенями.

7. Применение ПЦР в клинической лаборатории

Метод ПЦР может применяться для выявления в клинических образцах вирусов (гл. 17, 18), микобактерий, простейших и бактерий (гл. 19), а также для обнаружения врожденных и приобретенных генетических нарушений (гл. 21) и идентификации личности

(гл. 20). Вопрос о возможной сфере применения ПЦР подробно рассмотрен в обзоре [31].

Широкое использование ПЦР в клинике сдерживается тем, что хотя сама процедура ПЦР полностью автоматизирована, подготовка и последующий анализ ПЦР-продуктов проводятся вручную и весьма трудоемки. Однако эти этапы тоже можно автоматизировать, и вероятно, вскоре будут созданы специальные приборы для проведения ПЦР-анализа, аналогичные современным биохимическим анализаторам, используемым в клинических лабораториях.

Промежуточным этапом в автоматизации ПЦР может служить использование наборов для ПЦР типа Amplitype (Cetus), предназначенных для типирования аллельных вариантов гена HLA DQ альфа. Располагая такими наборами, в предварительно подготовленные пробирки для ПЦР надо добавить только анализируемую ДНК и $MgCl_2$. Праймеры в этом наборе биотинилированы, и амплифицированную ДНК легко детектировать после гибридизации с иммобилизованными зондами [8].

В настоящее время ПЦР-тесты можно ставить только в специально оснащенных клинических лабораториях. Образцы тканей, получаемые при обычных хирургических операциях, фиксируют формалином и заливают в парафин. Такие препараты можно исследовать методом ПЦР, что при необходимости позволяет провести молекулярно-генетический анализ без замораживания и хранения препаратов. После проведения обычных гистологических исследований, в большинстве случаев достаточных для постановки диагноза, некоторые препараты могут быть отправлены на ПЦР-анализ, позволяющий ответить на более специальные вопросы. Сфера применения ПЦР для целей диагностики будет постепенно расширяться, поскольку в клинической практике все чаще имеют дело с очень небольшими биоптатами (их получают, например, при эндоскопических исследованиях или это могут быть тонкоигольные аспираты и т. д.), обычный гистологический анализ которых затруднен. Перечислим вопросы, на которые можно получить ответ с помощью ПЦР.

а. Являются наблюдаемые нарушения привнесенными или в ткани действительно произошли неопластические изменения?

Это один из самых сложных вопросов. Часто проблема возникает вследствие слишком малых размеров препаратов или потому, что с ними обращались не должным образом (например, сдавливали, пересушивали и т. д.). Такие препараты можно без труда

Таблица 15.5. Некоторые генетические нарушения, выявляемые при помощи ПЦР

Генетические нарушения	Заболевания
Точковые мутации в гене K-ras	Аденокарцинома • легких (у курящих) • поджелудочной железы • толстого кишечника
Точковые мутации в гене N-ras	Острый миелолейкоз Миелодиспластический синдром Некоторые формы острого лимфолейкоза Миелома
t(14; 18)	Фолликулярная лимфома
t(9; 21)	Хронический миелолейкоз
t(8; 14)	Лимфома Беркитта
Вирусные инфекции	
Вирус гепатита В	Гепатоцеллюлярная карцинома
Вирус папилломы человека	Кондиломы, дисплазия и карцинома шейки матки Орофарингеальная неоплазия
HTLV-1	T-клеточный лейкоз / лимфома у взрослых
Вирус Эпштейна—Барр	Лимфома Беркитта, назофарингеальная карцинома, лимфома Ходжкина, неходжкинская лимфома

исследовать методом ПЦР и выявить в них те или иные молекулярно-генетические нарушения (некоторые из них перечислены в табл. 15.5). К сожалению, опыт применения методов ПЦР для диагностики заболеваний очень невелик, и в ряде случаев выявленные генетические нарушения оказывались характерны не только для опухолевой ткани, но и для нормальных тканей. Кроме того, генетические нарушения редко бывают строго специфичны для опухолей определенного типа. Тем не менее получаемые с помощью ПЦР данные могут использоваться для пополнения сведений, получаемых обычными гистологическими и другими методами, и позволяют более точно поставить диагноз.

6. Где находится первичная опухоль?

Нередко при биопсии берут кусочек ткани из области метастазов. При этом опухоль может быть диагностирована, но определить гистологическими методами ее первичную локализацию не удастся. В то же время ПЦР-анализ метастазов позволяет выявить молекулярно-генетические нарушения, характерные для конкретных первичных опухолей. Так, если в лимфоузле обнаруживается

вирус папилломы человека, то это свидетельствует об аногенитальной или орофарингеальной локализации первичной опухоли, а если вирус Эпштейна—Барр, то о назофарингеальной локализации.

в. Насколько полно излечено заболевание?

Морфологическая идентификация отдельных опухолевых клеток представляет большие трудности. Например, в биоптатах костного мозга редко удается выявить лейкоэмические клетки, если одна такая клетка приходится на 20 нормальных, а ПЦР-анализ легко позволяет сделать это. Небольшое число опухолевых клеток может присутствовать и в других органах и тканях — таких, как лимфатические узлы, периферическая кровь, СМЖ, моча, слезы.

ПЦР используют для выявления последовательностей-мишеней, ранее обнаруженных в первичной опухоли (см. табл. 15.5), в других органах и тканях. Наличие таких последовательностей говорит о присутствии в организме опухолевых клеток и, следовательно, о неполном излечении. Однозначно установить наличие в организме таких клеток можно с помощью амплификации последовательностей-мишеней, строго специфичных для данной опухоли. Например, анализ иммуноглобулиновых генов с перестройками [32], рецепторов Т-клеток [33], хромосомных транслокаций [34, 35] позволяет выявить клональную природу клеток и тканей с неоплазией. Каково клиническое значение обнаружения очень небольшого числа клеток, несущих специфичный для опухоли маркер, пока не вполне ясно. Можно лишь отметить, что ПЦР позволяет выявить минимальное число опухолевых клеток в организме и подобрать оптимальные методы лечения, когда какие-либо доклинические проявления заболевания еще отсутствуют.

г. Взят ли используемый образец ткани от данного больного?

Если есть подозрения на неправильную маркировку препарата, можно прибегнуть к следующей процедуре. Амплифицируют ген HLA DQ альфа (набор Amplitype, фирма Cetus) или любой другой высокополиморфный участок и полученный ПЦР-«отпечаток пальцев» препарата сравнивают с аналогичным ПЦР-«отпечатком пальцев» больного [36].

Литература

1. Mullis K. B., Faloona F. A. (1987). In Methods in enzymology, Vol. 155 (ed. R. Wu), pp. 335–50. Academic Press, London.
2. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. (1985). Science, 230, 1350.

3. *Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A.* (1988). *Science*, **239**, 487.
4. *Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J.* (ed.) (1990). *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, California.
5. *Erlich H. A.* (ed.) (1989). *PCR technology*. Stockton Press, New York.
6. *Kwok S., Kellogg D. E., McKinney N., Spasic D., Goda L., Levenson C., Sninsky J. J.* (1990). *Nucleic Acids Res.*, **18**, 999.
7. *Ehlen T., Dubeau, L.* (1989). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**, 441.
8. *Saiki R. K., Walsh P. S., Levenson C. H., Erlich H. A.* (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6230.
9. *Manos M. M., Ting Y., Wright D. K., Lewis A. J., Broker T. R., Wolinsky S. M.* (1989). *Molecular Diagnostics of Human Cancer*, **7**, 209–14. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
10. *Impraim C. C., Saiki R. K., Erlich H. A., Teplitz R. L.* (1987). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 710.
11. *Shibata D., Arnheim N., Martin W. J.* (1988). *J. Exp. Med.*, **167**, 225.
12. *Goelz S. E., Hamilton S. R., Volgelstein B.* (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**, 118.
13. *Dubeau L., Chandler L. A., Gralow J. R., Nichols P. W., Jones P. A.* (1986). *Cancer Res.*, **46**, 2964.
14. *Greer C. E., Peterson S. L., Kiviat N. B., Manos, M. M.* (1991). *Am. J. Clin. Pathol.*, **95**, 117.
15. *Shibata D., Martin W. J., Arnheim N.* (1988). *Cancer Res.*, **48**, 4564.
16. *Shibata D., Brynes R. K., Nathwani B. N., Kwok S., Sninsky J., Arnheim N.* (1989). *Am. J. Pathol.*, **135**, 697.
17. *Wright D. K., Manos M. M.* (1990). In *PCR protocols: a guide to methods and applications* (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White). pp. 153–8. Academic Press, San Diego, California.
18. *Shaunak S., Albright R. E., Klotman M. E., Henry S. C., Bartlett J. A., Hamilton J. D.* (1990). *J. Infect. Dis.*, **161**, 1068.
19. *Shibata D., Nichols P., Sherrod A., Rabinowitz A., Bernstein-Singer M., Hu E.* (1990). *Mod. Pathol.*, **3**, 71.
20. *Rowley A. H., Whitley R. J., Lakeman F. D., Wolinsky S. M.* (1990). *Lancet*, **335**, 440.
21. *Jackson D. P., Bell S., Payne J., Lewis F. A., Sutton J., Taylor G. R., Quirke P.* (1989). *Nucleic Acids Res.*, **17**, 10134.
22. *Haase A. T., Retzel E. F., Staskus K. A.* (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 4971.
23. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.* (ed.) (1989). *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
24. *Kwok S.* (1990). In: *PCR protocols* (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, T. J. White), pp. 142–5. Academic Press, San Diego, California.
25. *Higuchi R., Kwok S.* (1989). *Nature*, **339**, 237.
26. *Chou S.* (1990). *J. Infect. Dis.*, **162**, 738.
27. *Williams P., Simmond P., Yap P. L., Balfe P., Bishop J., Brettell R. et al.* (1990). *AIDS*, **4**, 393.
28. *Sarkar G., Sommer S. S.* (1990). *Nature*, **343**, 27.
29. *Cone R. W., Hobson A. C., Huang M. L. W., Fairfax M. R.* (1990). *Lancet*, **336**, 686.

30. See Walt Disney's Fantasia.
31. Eisenstein B. I. (1990). New Engl. J. Med., **322**, 178.
32. Yamada M., Hudson S., Tournay O., Bittenbender S., Shane S. S., Lang B., Tsujimoto Y., Caton A. J., Rovera G. (1989). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **86**, 5123.
33. Loh E. Y., Elliot J. F., Cwirla S., Lanier L. L., Davis M. M. (1989). Science, **243**, 217.
34. Lee M., Chang K., Cabanillas F. et al. (1987). Science, **237**, 175.
35. Crezenzi M., Seto M., Herzig G. P., Weiss P. D., Griffith R. C., Korsmeyer S. J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85**, 4869.
36. Shibata D., Namiki T., Higuchi R. (1990). Am. J. Surg. Pathol., **14**, 1076.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ДНК

Мейрион Б. Ллуэлин

1. Введение

В этой главе мы опишем метод определения нуклеотидной последовательности ДНК, который позволяет секвенировать фрагменты длиной от 300 до 500 п.н. На каждом из его этапов можно использовать несколько альтернативных процедур; мы остановимся только на тех из них, которые применяются в нашей лаборатории. Мы рассмотрим секвенирование только таких ДНК, которые можно получить с помощью ПЦР (гл. 15), поскольку интерес именно к таким продуктам наиболее велик [2]. Секвенирование двухцепочечной ДНК, метод Максама—Гилберта и другие методы описаны в книге [1].

Рассматриваемый здесь метод «терминации цепи» [3] включает как один из этапов синтез цепи ДНК на одноцепочечной ДНК-матрице с помощью ДНК-полимеразы. Для этого универсальный олигонуклеотидный праймер отжигают с ДНК-матрицей и проводят реакцию удлинения цепи, включая в нее dTTP, dGTP, dCTP и радиоактивно меченный dATP. Реакцию обрывают присоединением к растущим цепям дидезоксинуклеотидов ddTTP, ddCTP, ddGTP и ddATP (у них отсутствует 3'-гидроксильная группа, поэтому они не могут образовывать фосфодиэфирную связь) в ходе четырех отдельных реакций. В результате образуются семейства фрагментов ДНК, размер которых зависит от мест включения дидезоксинуклеотидов. Фрагменты можно разделить с помощью гель-электрофореза высокого разрешения и визуализировать с помощью радиоавтографии. Если продукты всех четырех реакций разделить в одном геле на параллельных дорожках, то нуклеотидную последовательность можно определить непосредственно по порядку расположения полос в «лестнице фрагментов» [4].

Применимость данного метода зависит от возможности получения одноцепочечных копий клонированных ДНК. Для этой цели можно использовать векторы на основе бактериофага M13 [5]. Двухцепочечную чужеродную ДНК можно клонировать в двухцепочечной репликативной форме (РФ) фаговой ДНК, при этом после трансформации в белковую оболочку будет упаковываться только одна из цепей ДНК. Во всех векторах типа M13mp исполь-

зуются сходные полилинкерные последовательности, поэтому для инициации полимеразных реакций пригоден один и тот же универсальный праймер. При амплификации смеси генов (например, семейства генов) необходимо провести клонирование ПЦР-продуктов в векторах типа M13, в результате каждый фаг будет содержать только одну вставку. При прямом секвенировании смеси генов наблюдается несколько одинаково расположенных полос в разных дорожках геля. При амплификации же одного гена можно проводить прямое секвенирование, не прибегая к промежуточному субклонированию.

2. Получение ПЦР-амплифицированной ДНК

Выбор оптимального праймера для ПЦР зависит от 5'- и 3'-концевых последовательностей амплифицируемого фрагмента ДНК. Кроме того, для встраивания ПЦР-продукта в полилинкерный сайт вектора M13 в 5'-конец праймеров должны быть включены подходящие рестрикционные сайты. В этом случае ПЦР-амплификация с последующей рестрикцией продукта позволит провести его встраивание в ДНК M13, рестрицированную тем же ферментом. В разные концы амплифицируемого фрагмента лучше включать сайты для разных рестриктаз, поскольку это позволит избежать отжига векторной ДНК самой на себя и обеспечит положение клонированной вставки в определенной ориентации (так называемое направленное клонирование). При подборе праймеров необходимо учитывать следующие факторы.

- а. Следует убедиться в том, что амплифицируемое семейство генов не содержит консервативного внутреннего рестрикционного сайта, идентичного сайту, включенному в праймер.
- б. После включения рестрикционного сайта 5'-конец праймера нужно удлинить, в противном случае рестриктаза не будет расщеплять праймер. Необходимая для каждого фермента длина выступающего участка и время рестрикции указаны в каталоге фирмы New England BioLabs.

Протокол 16.1. Очистка и рестрикция ПЦР-амплифицированной ДНК

Здесь рассмотрена рестрикция с помощью ферментов *EcoRI* и *HindIII*, но эта методика может применяться (с соответствующими изменениями) и для других ферментов. Использовались праймеры, содержащие рестрикционные сайты для *EcoRI* и *HindIII*.

Протокол 16.1 (Продолжение)

Материалы

- 10 × среднесолевой буфер: 0,1 М трис-НСl, рН 7,5, 0,1 М MgCl₂, 10 мМ ДТТ, бычий сывороточный альбумин, 1 мг/мл, 50 мМ NaCl
- 10 × ТБЭ: 108 г основного триса, 55 г борной кислоты, 40 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0, объем доведен до 1 л деионизованной водой
- 50 × ТАЭ: 242 г основного триса, 57,1 мл ледяной уксусной кислоты, 100 мл 0,5 М ЭДТА, рН 8,0, объем доведен до 1 л деионизованной водой
- 3 М ацетат натрия, рН 7,0
- Холодный этанол
- Фенол, насыщенный трис-ЭДТА: насыщают фенол 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА (метод насыщения описан в гл. 12)
- Смесь хлороформ : изоамиловый спирт (24:1, о/о)
- Рестриктирующие эндонуклеазы: *Hind*III и *Eco*RI
- Набор Geneclean® II (Bio 101, California, USA)

Методика

1. По окончании ПЦР (см. гл. 15) проводят электрофорез аликвоты (5 мкл из общего объема реакционной смеси 50 мкл) в 1% агарозном геле, содержащем 0,5 мкг/мл бромистого этидия, и определяют размер продуктов амплификации, сравнивая их с маркерными фрагментами на соседних дорожках.
2. Оставшиеся 45 мкл переносят в чистую пробирку и добавляют 255 мкл воды.
3. Депротеинизируют ДНК, добавив 300 мкл фенола, насыщенного ТЭ, и интенсивно перемешав.
4. Центрифугируют на микроцентрифуге при 1000 g в течение 2 мин и переносят верхнюю водную фазу (не захватывая интерфазу) в чистую пробирку.
5. Добавляют 300 мкл смеси фенол:хлороформ (1:1) и повторяют экстракцию.
6. Полученную водную фазу (примерно 250 мкл) переносят в чистую пробирку, добавляют 30 мкл 3 М ацетата натрия, рН 7,0, и 900 мкл (3 объема) чистого холодного этанола, охлаждают в течение 20 мин в сухом льду и собирают ДНК центрифугированием в микроцентрифуге при 1000 g и 4 °C в течение 20 мин.
7. Промывают осадок 70% спиртом, высушивают его под вакуумом и растворяют в 34 мкл воды.

8. К полученному раствору добавляют:

4 мкл 10 × среднесолевого буфера

1 мкл *Hind*III1 мкл *Eco*RI

9. Инкубируют в течение 12 ч при 37 °С и для отделения фрагментов маленького размера проводят электрофорез в 1,5% легкоплавком агарозном геле (окрашенном бромистым этидием) на ТАЭ-буфере.

10. Вырезают содержащий нужный фрагмент кусочек геля в УФ-свете и переносят его в предварительно взвешенную центрифужную пробирку.

11. ДНК из геля выделяют адсорбцией на стеклянном порошке с использованием набора Geneclean® II (это занимает ~ 20 мин). Полученную ДНК растворяют в 20 мкл воды.

3. Подготовка векторной ДНК бактериофага M13

В своей работе мы использовали вектор M13K19, полученный на основе вектора M13mp19 [6]. В его полилинкере содержится сайт для рестриктазы *Eco*K (наряду с четырьмя другими сайтами для «тупоконечных» рестриктаз). Если этот вектор с интактным полилинкером вводят путем трансформации в *Eco*K-позитивные штаммы *E. coli* (мы используем штамм BMH 71-18 [7], который можно получить через American Type Culture Collection, Rockvill, Maryland, USA), то он расщепляется. Это решает проблему фона. При работе с векторами типа M13mp рекомбинантные клоны можно отличить от вектора «дикого» типа за счет цветовой (белоголубой) селекции с помощью сред, содержащих 5-бром-4-хлор-3-индолил-β-галактозид (X-gal) [1]. Описанный в протоколе 16.2 метод можно использовать для получения ДНК любого фагового вектора; он очень удобен тем, что не требует очистки с помощью хлористого цезия. При этом предполагается, что ранее *Eco*K-негативный бактериальный штамм *E. coli* типа TG1 уже был трансформирован небольшими количествами РФ векторной ДНК (приобретенной у коммерческих фирм) и были получены фаговые бляшки (см. протокол 16.4).

Высокоочищенную двухцепочечную РФ векторной ДНК рестрицируют теми же ферментами, какие были выбраны для ПЦР-праймеров. При этом лучше сначала провести рестрикцию одним ферментом, проверить полноту линейаризации РФ и только потом осуществить вторую рестрикцию. После рестрикции (которую нет

необходимости проводить так же долго, как рестрикцию праймеров) РФ-ДНК очищают от вырезанного участка полилинкера с помощью электрофореза в легкоплавком агарозном ТАЭ-геле, как описано в протоколе 16.1. Это позволяет обойтись без обработки препарата щелочной фосфатазой. Чтобы определить концентрацию очищенной векторной ДНК М13, проводят ее электрофорез параллельно с электрофорезом стандартных фрагментов ДНК в ТВЭ-агарозном геле; доводят концентрацию до 20 нг/мкл (обычно для этого достаточно растворить полученный с помощью Geneclean® продукт в 20 мкл воды). После этого рестрицированные векторная ДНК и ПЦР-продукт готовы к лигированию.

Протокол 16.2. Выделение репликативной формы (РФ) с помощью хлористого лития (из 50 мл культуры)

Материалы

- Среда 2 × ТУ: 16 г бактотриптона, 10 г дрожжевого экстракта, 5 г NaCl растворяют в 900 мл деионизованной воды; доводят pH до 7,0 с помощью NaOH и объем до 1 л деионизованной водой. Стерилизуют автоклавированием
- ГТЭ: 50 мМ глюкоза, 25 мМ трис-HCl, pH 8,0, 10 мМ ЭДТА
- 0,2 М NaOH, 1% ДСН (хранят в пластиковой посуде)
- 10% ДСН
- Раствор ацетата калия: 29,4 г ацетата калия и 11,5 мл ледяной уксусной кислоты растворяют в 100 мл воды
- Изопропанол
- ТЭ: 10 мМ трис-HCl, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА
- Хлористый литий: 4,4 М
- РНКазы, свободная от ДНКаз (Boehringer Mannheim, Germany)
- Сухой лед

Методика

1. Снимают зубочисткой фаговую бляшку, вносят ее в 10 мл среды 2 × ТУ и качают при 37 °С.
2. Через 1 ч вносят в другую пробирку 10 мл среды 2 × ТУ, инфицированной ночной культурой TG1, и качают 2 ч при 37 °С.
3. Смешивают содержимое двух пробирок, доводят объем средой 2 × ТУ до 50 мл и инкубируют в течение 4 ч при 37 °С для инфицирования фагом TG1-клеток.
4. Центрифугируют в одноразовой пробирке на 50 мл (Falcon, Becton Dickinson, Oxnard, California) при 1000 g и 4 °С в течение 10 мин.

5. Ресуспендируют клетки в 4 мл холодного ГТЭ (во льду).
6. Добавляют 8 мл 0,2 М NaOH, 1% ДСН, хорошо перемешивают и инкубируют 5 мин во льду.
7. Добавляют 6 мл раствора ацетата калия, хорошо перемешивают и инкубируют 10 мин во льду.
8. Центрифугируют при 1000 g в течение 15 мин при 4 °С.
9. Супернатант (содержащий кольцевую ДНК) переливают в другую пробирку на 50 мл, а осадок и рыхлый преципитат (хромосомная ДНК и остатки клеток) отбрасывают. Добавляют к супернатанту 17 мл изопропанола и инкубируют 15 мин в сухом льду.
10. Центрифугируют при 1000 g 15 мин, сливают супернатант, переворачивают пробирку и протирают ее внутреннюю поверхность фильтровальной бумагой.
11. Ресуспендируют осадок в 2 мл ТЭ и пересаждают РНК 2,5 мл 4,4 М LiCl. Охлаждают 10 мин во льду.
12. Центрифугируют при 1000 g 15 мин, добавляют к супернатанту 10 мл абсолютного этанола и оставляют при комнатной температуре на 15 мин.
13. Собирают осадок центрифугированием при 1000 g в течение 15 мин, супернатант сливают и осадок промывают 70% этанолом.
14. Ресуспендируют осадок в 400 мкл ТЭ и переносят полученный раствор в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл.
15. Добавляют 2 мкл (4 ЕД) РНКазы, свободной от ДНКаз, и инкубируют 15 мин при 37 °С.
16. Добавляют 20 мкл 10% ДСН и помещают пробирку на 10 мин в водяную баню на 70 °С для инактивации магний-зависимой ДНКазы, которая может пересажаться вместе с ДНК.
17. Экстрагируют ДНК дважды фенолом и один раз фенолом : хлороформом (1:1), как описано в протоколе 16.1 (и в гл. 12).
18. Пересаждают ДНК этанолом в присутствии ацетата натрия, как описано в протоколе 16.1, но при комнатной температуре, иначе ДСН выпадет в осадок.
19. Промывают осадок ДНК 70% спиртом, собирают его центрифугированием при 12 000 g в течение 5 мин и растворяют в 50 мкл ТЭ.
20. Определяют концентрацию ДНК по УФ-поглощению (см. гл. 12) и доводят ее ТЭ-буфером до 1 мкг/мкл.

4. Лигирование векторной и ПЦР-амплифицированной ДНК

В большинстве работ этот этап описывают с помощью большого числа дифференциальных уравнений. Предложенный в протоколе 16.3 метод прост и не требует знания математики.

Протокол 16.3. Лигирование вектора и вставки

Материалы

- 10 × буфер для лигирования: 500 мМ трис-HCl, pH 7,6, 100 мМ MgCl₂, 100 мМ ДТТ, 50 мкг/мл БСА
- 10 мМ водный раствор γАТФ (доведения pH не требуется)
- ДНК-лигаза фага T4 (New England BioLabs, Massachusetts, USA; в настоящее время этот фермент поставляют вместе с буфером, содержащим АТФ)

Методика

1. В три микроцентрифужные пробирки на 0,5 мл вносят следующие компоненты по 1 мкл: 10 × буфер для лигирования, 10 мМ γАТФ, очищенный с помощью Geneclean® вектор, ДНК-лигазу¹⁾.
2. В первую, вторую и третью пробирки добавляют соответственно 1, 3 и 5 мкл очищенного с помощью Geneclean® ПЦР-амплифицированного фрагмента. Добавляют воду до 10 мкл.
3. Помешают пробирки в водяную баню на 15 °С как минимум на 3 ч (возможна и ночная инкубация).

¹⁾ Для контроля лигирования используют следующие образцы: только вектор; вектор и лигаза без вставки. Для оценки эффективности трансформации компетентных клеток (см. протокол 16.4) необходимо использовать не содержащий *EcoK*-сайта вектор.

5. Получение одноцепочечной рекомбинантной фаговой ДНК

Перед секвенированием двухцепочечную рекомбинантную ДНК M13 необходимо перевести в одноцепочечную форму. Для этого ее вводят путем трансформации в компетентные клетки *E. coli* (протокол 16.4). Такие клетки можно приготовить заранее и хранить в аликвотах в жидком азоте до 3 мес без существенного снижения эффективности трансформации. В основе описанной в протоколе 16.4 процедуры лежит метод, предложенный в работе [8].

Протокол 16.4. Приготовление замороженных компетентных клеток *E. coli* и получение бляшек фага M13

Материалы

- Среда SOB: 20 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта, 0,5 г NaCl растворяют в 950 мл деионизованной воды, добавляют 10 мл 250 мМ KCl, доводят pH с помощью NaOH до 7,0 и объем деионизованной водой до 1 л. Непосредственно перед использованием добавляют $MgCl_2$ и $MgSO_4$ до концентрации 10 мМ.
- RF1: 100 мМ RbCl, 50 мМ $MnCl_2 \cdot 4H_2O$, 30 мМ ацетат калия, pH 7,5, 10 мМ $CaCl_2 \cdot H_2O$, 15% (в/о) глицерин. pH полученного раствора доводят до 5,8 0,2 М уксусной кислотой.
- RF2: 10 мМ MOPS, pH 6,8, 10 мМ RbCl, 75 мМ $CaCl_2 \cdot H_2O$, 15% (в/о) глицерин. pH полученного раствора доводят NaOH до 6,8.
- Штамм *E. coli* BMH 71-18.

Растворы RF1 и RF2 стерилизуют фильтрацией через мембрану с диаметром пор 0,45 мкм (Nalgene®, New York), используя при этом одноразовую посуду: даже следы детергентов разрушают бактериальные клетки.

Методика

1. Снимают несколько колоний *E. coli* BMH 71-18, выращенных на минимальном агаре с глюкозой, и ресуспендируют их в 1 мл среды SOB, содержащей $MgCl_2$ и $MgSO_4$. Инкубируют при 37 °C в течение ночи.
2. Полученную культуру вносят в 100 мл среды SOB (содержащей $MgSO_4$), налитой в колбу на 1 л (колба должна быть вымыта без детергентов), и инкубируют при 37 °C и умеренной аэрации до $OD_{595} = 0,5$ (~100 мин).
3. Переносят бактериальную культуру в две полипропиленовые пробирки на 50 мл и охлаждают их 15 мин во льду.
4. Клетки собирают центрифугированием при 750 g в течение 15 мин при 4 °C и максимально полно сливают супернатант.
5. Ресуспендируют клетки встряхиванием в 16 мл (1/3 первоначального объема) буфера RF1 и инкубируют их во льду в течение 15 мин.
6. Снова собирают клетки центрифугированием при 4 °C, ресуспендируют их в 4 мл (1/12,5 первоначального объема) буфера RF2 и инкубируют во льду 15 мин.
7. Суспензию (по 0,5–1 мл) разливают в пробирки с завинчивающимися крышками, быстро замораживают в жидком азоте и хранят в жидком азоте или при –70 °C.

Протокол 16.4 (Продолжение)

Получение бляшек

Материалы

- ТУЕ-чашки: 15 г агара, 8 г NaCl, 10 г бактотриптона, 5 г дрожжевого экстракта растворяют в 1 л дистиллированной воды
- Расплавленный верхний агар: 10 г триптона, 8 г NaCl, 7 г агара на 1 л
- Замороженные компетентные клетки

Методика

1. В водяную баню на 42 °С помещают три стеклянные пробирки с 3 мл расплавленного верхнего агара.
2. В каждую пробирку вносят 50 мкл выращенной в 1 мл среды 2 × ТУ ночной культуры *E. coli* BMH 71-18 (см. протокол 16.2).
3. Прогревают три чашки с ТУЕ-агаром в термостате на 37 °С (в холодных чашках верхний агар слишком быстро застывает).
4. Размораживают компетентные клетки, подержав пробирку в руках, и сразу помещают пробирку в лед.
5. Вносят по 150 мкл компетентных клеток в три полипропиленовые круглодонные пробирки (Falcon 2063).
6. Добавляют по 5 мкл каждой из трех лигазных смесей (см. протокол 16.3) и инкубируют клетки во льду в течение 30 мин.
7. Помещают пробирки с клетками на 2 мин в водяную баню на 42 °С и снова переносят их в лед (тепловой шок).
8. Содержимое пробирки с расплавленным агаром переливают в пробирку с клетками, подвергнутыми тепловому шоку, перемешивают и максимально полно выливают содержимое в чашку с ТУЕ-агаром. Такую же операцию проводят с двумя другими пробирками.
9. Дают агару застыть в течение 10 мин и помещают чашки (в перевернутом состоянии) в термостат на 37 °С. Через 8 ч зараженные бактериофагом M13 (и, следовательно, более медленно растущие) клетки образуют мутные бляшки на фоне бактериальной культуры. Появление прозрачных бляшек может говорить о загрязнении культуры Т-фагами.

5.1. Выделение одноцепочечной ДНК

Бляшки, содержащие одноцепочечные рекомбинантные фаги, необходимо выколоть, нарастить в бактериальной культуре и депротеинизировать. Чашки с ТУЕ-агаром после образования

бляшек можно хранить в холодильнике. В протоколе 16.5 описана процедура получения 20 матриц для секвенирования, которых достаточно для нанесения на два секвенирующих геля.

Протокол 16.5. Выделение одноцепочечной ДНК

Материалы

- Полиэтиленгликоль (ПЭГ): 20% ПЭГ 6000, 2,5 М NaCl
- Среда 2 × TY (см. протокол 16.2)
- Стерильные зубочистки

Методика

1. В 100 мл среды 2 × TY вносят 1 мл ночной культуры *E. coli* BMH 71-18 и разливают по 1,5 мл в 20 стеклянных пробирок.
 2. Снимают бляшку зубочисткой и переносят ее в пробирку. Прореживают то же самое с 19 другими бляшками, выбирая те из них, которые хорошо отделены друг от друга. Инкубируют при 37 °C в течение 5 ч и интенсивном встряхивании. Более продолжительная инкубация приводит к лизису бактерий и загрязнению ДНК молекулами РНК.
 3. Переносят культуру в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл и центрифугируют в микроцентрифуге при 12 000 g в течение 5 мин.
 4. Переносят 1 мл супернатанта (содержащего чистый фаг) во вторую пробирку на 1,5 мл, добавляют 200 мкл ПЭГ и инкубируют при комнатной температуре как минимум 15 мин.
 5. Собирают фаг центрифугированием в течение 5 мин при 12 000 g и отбирают супернатант.
 6. Быстро повторяют центрифугирование и полностью удаляют все следы супернатанта.
 7. Ресуспенсируют фаг в 300 мкл воды.
 8. Дважды проводят экстракцию равным объемом смеси фенол : хлороформ (1:1), осаждают ДНК ацетатом натрия, промывают ее 70% этанолом и высушивают под вакуумом (см. протокол 16.1).
 9. Растворяют ДНК в 30 мкл воды. Полученная ДНК представляет собой одноцепочечную матрицу для секвенирования.
-

6. Секвенирование

При секвенировании методом терминации цепи, описанным в работе [3], присоединение нуклеотидов к растущей цепи ДНК катализируется фрагментом Кленова ДНК-полимеразы I *E. coli*.

Однако ДНК-полимераза фага Т7 обладает по сравнению с фрагментом Кленова некоторыми преимуществами: большим числом оборотов и большой скоростью полимеризации, что позволяет получать длинные фрагменты при очень малом числе неправильных терминаций. Имеющиеся в продаже наборы для секвенирования позволяют осуществить его очень быстро, и мы настоятельно рекомендуем пользоваться ими. ДНК-полимераза Т7 входит в состав набора Sequenase® II (United State Biochemical, Cleveland, Ohio, USA), а также наборов, выпускаемых фирмами Promega (Madison, Wisconsin) и Amersham (Amersham, UK). Набор Sequenase® II содержит также реактивы для секвенирования с dITP и буферы, содержащие марганец; в данном разделе будет описан основной набор Sequenase®. Представленный в протоколе 16.6 метод секвенирования предполагает использование микротитровальных плашек, а следовательно, центрифуги с адапторами для их центрифугирования (типа IEC Centra 4B), а также термостатов для микроплашек (типа Techne Dri-plate® cycler MW1, UK) для проведения реакции терминации при 42 °С. С альтернативными методами можно ознакомиться, прочитав статью [1] или описания к наборам для секвенирования.

Протокол 16.6. Секвенирование

Материалы

- 5 × реакционный буфер: 200 мМ трис-НСl, рН 7,5, 100 мМ MgCl₂, 250 мМ NaCl
- Буфер для разведения фермента: 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 5 мМ ДТТ, 0,5 мг/мл БСА
- 5 × смесь для мечения: по 7,5 мкМ dGTP, dCTP, dTTP
- Смесь для ddG-терминации: по 80 мкМ dGTP, dATP, dCTP, dTTP, 8 мкМ ddGTP, 50 мМ NaCl
- Смесь для ddA-терминации: по 80 мкМ dGTP, dATP, dCTP, dTTP, 8 мкМ ddATP, 50 мМ NaCl
- Смесь для ddC-терминации: по 80 мкМ dGTP, dATP, dCTP, dTTP, 8 мкМ ddCTP, 50 мМ NaCl
- Смесь для ddT-терминации: по 80 мкМ dGTP, dATP, dCTP, dTTP, 8 мкМ ddTTP, 50 мМ NaCl
- Стоп-раствор: 90% формамид, 20 мМ ЭДТА, 0,05% бромфеноловый синий, 0,05% ксилюлцианол

- Универсальный праймер для секвенирования —40 (0,5 пмоль/мкл)
- [^{35}S]dATP α S (1 мКи/37 МБк в 100 мкл) (Amersham, UK; в состав набора не входит)
- 0,1 М ДТТ

Методика

Все реактивы добавляют с помощью диспенсера на 2 мкл Hamilton (PB600), соединенного с адаптором и шприцом 1710 с газовым затвором. Смесь для мечения предварительно разбавляют в пять раз.

1. Для каждой секвенируемой матрицы смешивают в микроцентрифужной пробирке на 1,5 мл для получения праймерной смеси 6 мкл воды, 1 мкл универсального праймера и 2 мкл реакционного буфера.
2. Размечают микроплашку Falcon 3911. В верхней ее части наносят номера клонов, а слева, сверху вниз, — буквы TCGA.
3. На дно каждой ячейки наносят 2 мкл праймерной смеси, на боковые стенки — по 2 мкл раствора секвенируемой матрицы и центрифугируют плашку. Накрывают ее пленкой Saran® и крышкой и помещают в водяную баню с температурой 70 °C на 5 мин. Охлаждают плашку на столе (за это время происходит отжиг праймера и ДНК M13).
4. Пока плашка охлаждается, готовят смесь для мечения. Для этого в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл вносят 0,5 мкл ^{35}S -dATP, 1 мкл 0,1 М ДТТ, 2 мкл разведенной смеси для мечения и 3,5 мкл воды.
5. Размечают поликарбонатную микроплашку Techne 96® так же, как первую плашку, и в ячейки в ряду «Т» вносят по 2 мкл смеси для ddT-терминации. Аналогичным образом вносят смесь для терминации в ячейки остальных рядов и помещают плашку в термостат для микроплашек с температурой 42 °C.
6. После охлаждения плашки (п. 3) в течение 30 мин добавляют к смеси для мечения (для каждой матрицы) последовательно 1,77 мкл буфера для разведения фермента и 0,22 мкл фермента Sequenase® II. (Это позволяет держать фермент Sequenase® II вне холодильника минимальное время.)
7. По 2 мкл этой смеси наносят на боковую стенку ячеек, содержащих праймерную смесь, и центрифугируют плашку для перемешивания компонентов. Включают секундомер.

Протокол 16.6 (Продолжение)

8. Через 2 мин начинают переносить раствор из ячеек первой плашки в соответствующие ячейки предварительно нагретой и помещенной в термостат поликарбонатной плашки. Для этого используют обычную микропипетку, быстро меняя наконечники после каждой ячейки (помните, что использованные наконечники радиоактивны).
9. После того как перенесен раствор из последней ячейки, включают секундомер и в наконечник на шприце Hamilton набирают стоп-раствор.
10. Через 5 мин наносят по 5 мкл стоп-раствора на боковую стенку каждой ячейки и центрифугируют плашку. После центрифугирования плашку, закрытую крышкой, можно хранить в морозильнике до использования (при -20°C ^{35}S -продукты можно хранить в течение недели).

В инструкции к набору Sequenase® II описано, как проводить секвенирование в пробирках, а не в микроплашках. Это может быть полезно в том случае, если отсутствует необходимое для работы с микроплашками оборудование.

7. Электрофорез в геле

7.1. Подготовка секвенирующего геля

Смесь фрагментов ДНК разной длины, образовавшуюся в каждой ячейке микроплашки, фракционируют при помощи электрофореза в полиакриламидном геле. В присутствии катализаторов персульфата аммония (AMPS) и N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамина (TEMED) акриламид полимеризуется с образованием длинных линейных молекул полиакриламида. Если в смесь мономеров добавлен N,N'-метиленабисакриламид, то линейные цепочки разветвляются, и между ними образуются мостики (сшивки). В протоколе 16.7 описан способ приготовления полиакриламидного геля с градиентом буфера [10]. В его нижней трети концентрация соли более высокая, что приводит к торможению более коротких и, следовательно, более подвижных фрагментов и повышает разрешающую способность геля. Если высокая разрешающая способность не требуется, то можно приготовить гель на основе 0,5х смеси для геля (протокол 16.7).

Приборы для электрофореза выпускает несколько фирм (например, International Biotechnologies Inc. Base Runner®, New

Haven, Connecticut, USA). Наиболее приемлемы стеклянные пластины для гелей длиной 60 см и прокладки толщиной 0,4 мм. Используя гребенку типа «акулы зубы» с 48 зубьями и толщиной 0,4 мм (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, Maryland, USA), можно провести на одной такой пластине 12 реакций. Гель, приготовленный в соответствии с протоколом 16.7, можно применять при работе на любом приборе для электрофореза.

Протокол 16.7. Приготовление секвенирующего геля с градиентом буфера

Все операции необходимо выполнять в перчатках.

Материалы

- 40% акриламид: сухие акриламид, 380 г, и N,N'-метиленбисакриламид, 20 г, растворяют в 1 л деионизованной воды, добавляют 1 г ионообменной смолы Amberlit MB1 и перемешивают в течение 10 мин. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр (ватман) и хранят при 4 °C в сосуде из темного стекла. NB! Акриламид высокотоксичен
- 25% AMPS (каждый раз используют свежеприготовленный раствор)
- TEMED (BDH, Poole, Dorset)
- 10 × ТБЭ (см. протокол 16.1)
- Раствор диметилхлорсилана (BDH, UK)

Методика

1. Готовят смесь для геля 5 × ТБЭ, 6% акриламид. Для этого берут 92 г мочевины, 30 мл 40% акриламида, 100 мл 10 × ТБЭ, 10 мл бромфенолового синего и доводят объем до 200 мл деионизованной водой. Полученный раствор фильтруют через бумажный фильтр (ватман) и хранят при 4 °C до 1 мес.
2. Готовят смесь для геля 0,5 × ТБЭ, 6% акриламид. Для этого берут 23 г мочевины, 7,5 мл 40% акриламида, 2,5 мл 10 × ТБЭ и 25 мл деионизованной воды. Раствор фильтруют в стакан на 100 мл через бумажный фильтр и используют только свежеприготовленным.
3. В теплом растворе детергента моют стеклянные пластины для геля и прокладки, ополаскивают их в дистиллированной воде. Протирают пластины этанолом с помощью Kimwipes®, чтобы полностью удалить следы жира, а затем протирают ацетоном.

Протокол 16.7 (Продолжение)

4. Одно из стекол помечают и силиконизируют его, растерев по поверхности 2 мл раствора диметилхлорсилана. Силиконизированную поверхность промывают деионизованной водой, этанолом и ацетоном.
5. Кладут на стол стеклянную пластину большего размера и укрепляют по ее боковым сторонам гибкие пластиковые прокладки. На эти прокладки помещают меньшую пластину и с помощью клейкой ленты (3M, BRL) плотно проклеивают края стекол по бокам и снизу. Каждую сторону получившейся формы для геля зажимают двумя большими зажимами типа «бульдог».
6. В стакан на 10 мл наливают 7,5 мл синей 5 × ТБЭ-смеси для геля.
7. К 50 мл 0,5 × ТБЭ-смеси для геля в стакане на 100 мл добавляют 65 мкл AMPS и 65 мкл TEMED и полученную смесь перемешивают.
8. К 7,5 мл синей 5 × ТБЭ-смеси для геля добавляют 16 мкл AMPS и 16 мкл TEMED и полученную смесь перемешивают.
9. Набирают в шприц на 50 мл 30 мл 0,5 × ТБЭ-смеси для геля и кладут шприц на стол.
10. Из оставшейся в стакане 0,5 × ТБЭ-смеси для геля отбирают пипеткой с шариками 6,5 мл и затем той же пипеткой отбирают из стакана на 10 мл всю 5 × ТБЭ-смесь. Тщательно перемешивают, продувая содержимое пипетки через шарики.
11. Устанавливают форму для геля под углом ~ 45° к поверхности стола и медленно выливают в нее содержимое пипетки, одновременно опуская форму так, чтобы когда пипетка опустеет, форма лежала горизонтально.
12. Берут со стола шприц и продолжают заливку, одновременно медленно поднимая форму. Когда форма будет полностью заполнена, подставляют под ее верхний край стакан на 10 мл (это обеспечит оптимальный угол наклона формы). Все пузырьки воздуха из верхней части геля удаляют с помощью прокладки толщиной менее 0,4 мм.
13. Плоской стороной вводят гребенку «акулы зубы» в щель формы на глубину около 6 мм. В глубокий вырез с каждой стороны верхней части формы помещают по зажиму типа «бульдог», а второй парой зажимов прижимают нижнее маркированное стекло к верхнему. Оставляют форму для полимеризации геля как минимум на 1 ч. Если форму оставляют на ночь, то ее верхнюю часть накрывают тканью, смоченной в буфере 1 × ТБЭ, и закрывают пленкой типа Saran®.

7.2. Нанесение образцов и проведение электрофореза

В протоколе 16.8 описана процедура нанесения образцов и проведения электрофореза в геле, приготовленном согласно протоколу 16.7.

Протокол 16.8. Нанесение образцов и проведение электрофореза

1. Отмывают деионизованный водой гель, запolyмеризовавший-ся с внешней стороны формы, и снимают зажимы. Медленно под струей деионизованной воды удаляют гребенку.
2. Скальпелем или бритвой срезают с нижней части формы липкую ленту и помещают форму в прибор для электрофореза.
3. Заполняют верхнюю и нижнюю электрофорезные камеры буфером 1 × ТБЭ. Для удаления незаполимеризовавшегося акриламида и мочевины промывают верхнюю часть геля при помощи шприца.
4. Вставляют гребенку так, чтобы острые кончики зубцов чуть-чуть входили в гель. Убеждаются в том, что гребенка вставлена плотно и не подтекает. Для этого наносят по несколько микролитров синего стоп-раствора с формамидом из набора для секвенирования в средней части и с краев гребенки (лучше всего для этого использовать микропипетку с наконечниками типа Multi-Flex®).
5. Поликарбонатную микроплашку, в ячейки которой нанесена смесь для секвенирования, помещают на 15 мин на термоблок или в термостат с температурой 80 °C для денатурации и концентрирования образцов (следует иметь в виду, что плашки Falcon могут деформироваться). В это время промывают дорожки секвенирующего геля с помощью микропипетки.
6. В заранее выбранном порядке (например, TCGA) наносят в каждую ячейку 2 мкл образца. Весь процесс нанесения надо завершить за 30 мин, иначе произойдет частичная ренатурация образцов.
7. Подсоединяют прибор к источнику питания (мы используем источник питания LKB 2197) и проводят электрофорез при 45 Вт в течение 4 ч (для геля длиной 60 см). Результаты такого четырехчасового электрофореза позволяют определить время, необходимое для секвенирования конкретной последовательности.

7.3. Радиоавтография

Радиоавтографию секвенирующего геля проводят в соответствии с протоколом 16.9.

Протокол 16.9. Радиоавтография

1. По окончании электрофореза отсоединяют источник питания и сливают буфер ТБЭ. (Следует помнить, что буфер в нижней камере после электрофореза становится радиоактивным.)
2. Вынимают форму из прибора для электрофореза, снимают с нее липкую ленту и кладут форму на стол так, чтобы маркированная стеклянная пластина оказалась сверху. Между стеклами вставляют скальпель или шпатель и осторожно разъединяют их.
3. Для удаления мочевины и фиксации геля помещают стеклянную пластинку с гелем в неглубокую ванночку с водным раствором 10% уксусная кислота/10% метанол и выдерживают 15 мин без перемешивания.
4. Вынимают пластину с гелем, дают стечь лишней жидкости и подсушивают на столе в течение ~ 10 мин.
5. На гель кладут лист хроматографической бумаги ватман 3ММ (он должен выступать за края геля со всех сторон на 3 см) и слегка прижимают его к гелю. Снимают бумагу с прилипшим к ней гелем и кладут ее гелем вверх на второй лист бумаги.
6. Поверх геля кладут пленку Sagan® и обрезают как эту пленку, так и хроматографическую бумагу до размера геля.
7. Высушивают гель в сушке для гелей под вакуумом при температуре 80 °С в течение 40 мин (пленка Sagan® должна быть наверху).
8. Приподнимают пленку с одного угла и проверяют, высох ли гель. Если гель липкий, его надо досушить еще в течение 10 мин.
9. Снимают пленку с высушенного геля и оценивают его радиоактивность с помощью счетчика Гейгера. При наличии определенного опыта это позволяет определить время экспозиции при радиоавтографии.
10. Гель и рентгеновскую пленку (Кодак XAR или Fuji RX) помещают в кассету для рентгеновской пленки без усиливающих экранов и экспонируют при комнатной температуре в течение 16–48 ч.
11. Проявляют пленку и «читают» нуклеотидную последовательность ДНК.

8. Прямое секвенирование ПЦР-амплифицированной ДНК

Для выявления мутаций в специфических генах, представленных в геноме только одной или двумя (аллельными) копиями (например, для выявления мутаций, ассоциированных с серповидноклеточной анемией), гораздо удобнее секвенировать непосредственно ПЦР-амплифицированную ДНК. Если амплифицируются и секвенируются оба аллеля данного гена, то мутацию с помощью секвенирующего геля можно идентифицировать, только если нуклеотидная последовательность нормального гена известна. Когда ген представлен только одним аллелем (как в ДНК митохондрий), то нуклеотидная последовательность соответствующего локуса определяется непосредственно. (Имейте в виду, что разрешение на использование наборов для секвенирования в целях диагностики заболеваний человека отсутствует.) Разработано несколько методов прямого секвенирования [11]. Например, к двухцепочечной ПЦР-амплифицированной ДНК после удаления праймеров и невключившихся нуклеотидов с помощью электрофореза или хроматографии с центрифугированием может быть добавлен радиоактивно меченный праймер. При «ассиметричном» ПЦР-секвенировании используют два праймера в разных молярных количествах, в результате чего образуется избыток одноцепочечного ПЦР-продукта. При этом концентрация одного из праймеров становится лимитирующей и второй праймер обеспечивает синтез одноцепочечной ДНК. В этом случае перед секвенированием также необходимо удалить лишние нуклеотиды и ПЦР-праймеры.

Метод, которым пользуемся мы в своей работе, описан в протоколе 16.10. Он основан на применении одного биотинилированного праймера и позволяет получать чистую одноцепочечную ДНК. Для этого к ПЦР-амплифицированной ДНК мы добавляем покрытые стрептавидином магнитные частицы и с помощью магнита удаляем вторую цепь ДНК, ПЦР-праймеры и невключившиеся нуклеотиды [2]. Биотинилирование праймера лучше всего проводить, включая биотинилированный нуклеотид в 5'-концевую часть праймера во время его синтеза.

Протокол 16.10. Прямое ПЦР-секвенирование с использованием магнитных частиц

Материалы

- Покрытые стрептавидином магнитные частицы (Dynabeads® М-280, Dynal (UK) Ltd, Wirtal, UK)

Протокол 16.10 (Продолжение)

- Магнит для работы с микроцентрифужными пробирками на 1,5 мл (Dyna1 MPC®-E)
- ФСБ: 10 мМ фосфат, 150 мМ NaCl, pH 7,2
- ФСБ/БСА: 4,5 мл ФСБ и 0,5 мл раствора БСА в концентрации 10 мг/мл
- 0,15 М NaOH

Методика

1. Проводят ПЦР, как обычно (см. гл. 15). При этом в реакционной смеси объемом 50 мкл должно содержаться по 5 пмоль каждого праймера, поскольку избыток биотинилированного праймера снижает эффективность очистки с помощью магнитных частиц.
2. Аликвоту частиц Dynabeads (10 мг/мл) объемом 20 мкл вносят в чистую микроцентрифужную пробирку и помещают пробирку в магнит на 30 с. При этом магнитные частицы собираются (обычно в виде полосы) на стенках пробирки.
3. Добавляют в пробирку 1 мл ФСБ/БСА, снимают ее с магнита и осторожно перемешивают содержимое пробирки.
4. Снова помещают пробирку в магнит и отбирают всю жидкость. Повторяют процедуру отмывания пять раз, с тем чтобы полностью отмыть входящий в состав Dynabeads антибактериальный агент азид натрия. Ресуспендируют магнитные частицы в 20 мкл ФСБ/БСА.
5. 20 мкл ресуспендированных магнитных частиц переносят в чистую центрифужную пробирку на 1,5 мл с ПЦР-амплифицированной ДНК (при этом нет необходимости удалять из ПЦР-смеси минеральное масло) и инкубируют 15 мин.
6. Помещают пробирку на 30 с в магнит, отбирают всю жидкость и добавляют 50 мкл 0,15 М NaOH. Снимают пробирку с магнита и инкубируют ее 5 мин.
7. Повторяют п. 6.
8. Промывают пробирку 0,5 мл воды и ресуспендируют ее содержимое в 10 мкл воды. Полученную при этом ДНК можно использовать как матрицу для секвенирования (см. протокол 16.6). Ее количества достаточно для проведения одного набора (четыре дорожки) реакций.

Начинать секвенирование лучше с внесения в каждую ячейку микроплашки 2 мкл матрицы (см. протокол 16.6). В дальнейшем может оказаться необходимым изменить объемы как матрицы, так

и праймера. Если интенсивность сигнала при секвенировании по всей длине последовательности мала, то необходимо увеличить количество праймера. Можно использовать также внутренний праймер, дающий меньшую частоту ложных терминаций. Начинают секвенирование при концентрации праймера 0,5 пмоль/мкл, увеличивая ее в последующих реакциях в 10 раз.

Благодарности

Автор весьма признателен д-ру Greg Winter и Michael Tristem за плодотворные дискуссии и советы.

Литература

1. *Howe C. J., Ward E. S. (ed.) (1989). Nucleic acids sequencing: a practical approach* IRL Press, Oxford.
2. *Gyllenstein U. B. (1989). Biotechniques, 7, 700.*
3. *Sanger F., Nicklen S., Coulson A. R. (1977). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463.*
4. *Watson J. D. (1987). In: Molecular biology of the gene (ed. J. D. Watson, N. H. Hopkins, J. W. Roberts, J. A. Steitz, A. M. Weiner). p. 277. Benjamin/Cummings Co., Menlo Park, California.*
5. *Messing J. (1983). In: Methods in enzymology, Vol. 101 (ed. R. Wu, L. Grossman, K. Moldave), p. 20. Academic Press, London.*
6. *Carter P., Bedouelle H., Waye M. Y., Winter G. P. (1985). Oligonucleotide site-directed mutagenesis in M13. Anglian Biotechnology Ltd, Hawkins Road, Colchester, UK.*
7. *Gronenborn B. (1976). Mol. Gen. Genet., 148, 243.*
8. *Hanahan D. (1983). J. Mol. Biol., 166, 557.*
9. *Tabor S., Richardson C. C. (1989). J. Biol. Chem., 264, 6447.*
10. *Biggin M. D., Gibson T. J., Hong G. F. (1983). Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 3963.*
11. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis, T. (ed.) (1989). Molecular cloning, a laboratory manual* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.

ПРИМЕНЕНИЕ ПЦР ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАПИЛЛОМАВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ ГЕНИТАЛИЙ

Хейди М. Бауэр, Катрин Е. Грир, М. Мишель Маню

1. Введение

Вирусы папилломы человека (HPV), инфицирующие гениталии, передаются половым путем. По-видимому, они служат основным провоцирующим фактором в развитии некоторых аногенитальных форм рака, в частности рака шейки матки, аденокарциномы, рака влагалища, полового члена и т. д. [1, 2]. Для выяснения роли этих вирусов в возникновении различных патологий очень важно располагать чувствительными и точными методами их выделения и типирования в нормальных тканях, тканях при дисплазиях и в опухолях. Проводя скрининг больных на наличие у них HPV определенных типов, можно получить ценную клиническую информацию.

Группа вирусов папилломы человека, известных также как вирусы бородавок, включает свыше 65 различных типов вирусов, вызывающих бородавки кожи и слизистых [3]. Более 20 из них инфицируют гениталии и слизистую ануса. HPV типов 6 и 11 обычно связаны с незлокачественными аногенитальными папилломами, а типов 16 и 18 — с карциномами. Другие типы HPV (например, 31, 39 и 45) также связаны с инвазивным раком или карциномами. Методы культивирования HPV, которые позволяли бы проводить диагностику *in vitro*, отсутствуют, поэтому возникает настоятельная необходимость в разработке способов прямого выявления вирусных последовательностей в клиническом материале.

1.1. Полимеразная цепная реакция: обзор

Амплификация ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) лежит в основе высокочувствительного метода обнаружения специфических нуклеиновых кислот. В данной главе описана система выявления HPV, в которой используются вырожденные праймеры или смесь «консервативных» праймеров [4–6], позволяющие амплифицировать специфические сегменты ДНК HPV разных типов. Один из наборов HPV-праймеров гибридизуется с высококонсервативными поздними генами L1, кото-

рые кодируют капсидный белок. Для детекции продуктов амплификации используется набор длинных (400 п.н.) зондов [7], позволяющих идентифицировать HPV типов 6, 11, 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 40, 42, 45, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 59 и по меньшей мере 25 других, пока не идентифицированных типов.

Другой набор HPV-праймеров гибридизуется с ранними генами E6, которые, по-видимому, сохраняются и после того, как вирусная ДНК проникает в клетку. В этой системе амплификации используется смесь консервативных праймеров, которые позволяют амплифицировать ДНК HPV типов 6, 11, 16, 18, 31, 33, 39, 42, 54 и 52 [6]. Мы не знаем, можно ли с помощью этих праймеров идентифицировать такой же широкий спектр HPV, как с помощью консервативных праймеров, специфичных для генов L1. Поскольку консервативный зонд для HPV E6 пока отсутствует, для детекции продуктов амплификации используют типоспецифичные олигонуклеотидные зонды.

Из неочищенной суспензии клеток, полученной из клинических образцов ткани, выделяют ДНК и амплифицируют ее, используя консервативные и β -глобиновые праймеры. Параллельная амплификация β -глобиновых генов служит внутренним контролем чистоты образца (см. также гл. 15).

ПЦР-продукты сначала анализируют с помощью гель-электрофореза в присутствии бромистого этидия, а для точного типирования вирусной ДНК используют дот-блот-гибридизацию. Наличие амплифицированных последовательностей области L1 определяют путем гибридации со смесью консервативных зондов. Для идентификации разных типов HPV используют типоспецифичные олигонуклеотидные зонды. Этим методом можно выявить даже 10 копий ДНК HPV на фоне того количества ДНК человека, которое содержится в 1000 клеток.

1.2. Применение ПЦР в клинике

Описанный выше метод можно использовать для анализа разных клинических образцов, в частности мазков, соскобов, смывов, биоптатов и тканей, заключенных в парафин. Образцы можно получить неинвазивным путем, из слизистых полости рта, ануса или гениталий, а также из эпидермиса.

Применение ПЦР для идентификации HPV в свежевыделенном клиническом материале позволяет медикам и эпидемиологам проследить связь между HPV-инфекцией и развитием данной патологии. Для определения роли вируса в возникновении забо-

левания, а также факторов риска, повышающих вероятность инфекции, можно предпринять молекулярно-эпидемиологические исследования.

Применение ПЦР для анализа фиксированных, заключенных в парафин тканей предоставляет молекулярным биологам и патологам прекрасную возможность исследовать обширные коллекции архивного материала (см. также гл. 15), например в целях ретроспективного анализа гистологических изменений, вызванных HPV. Кроме того, можно проследить участие HPV в развитии новообразований и оценить клиническую значимость типирования HPV.

2. Обработка клинических образцов

Вследствие высокой специфичности методов ПЦР-амплификации очень важно, чтобы с образцом проводилось как можно меньше манипуляций. Ниже мы рассмотрим способ получения неочищенного клеточного лизата, пригодного для ПЦР-теста. Загрязнение клинических образцов во время их подготовки может происходить тремя путями: при переносе материала от одного образца к другому, в результате случайного попадания в образец постороннего ПЦР-продукта, при занесении в него плазмид, содержащих ДНК HPV, или клеток, инфицированных HPV. Чтобы исключить две последние возможности внесения загрязнений, все работы следует проводить в специально отведенном месте, куда не могут попасть ДНК HPV или ПЦР-продукты даже в следовых количествах. Во избежание загрязнения первым способом при работе с образцами (например, открывании и закрывании пробирок) необходимо соблюдать предельную осторожность. Следует пользоваться только стерильными съёмными наконечниками к пипеткам и перчатками, а последние менять как можно чаще. Оборудование и рабочие поверхности нужно регулярно дезинфицировать. Все эти меры предосторожности следует соблюдать в клиниках и больницах при отборе образцов.

Для мониторинга загрязнений, определения воспроизводимости результатов и чувствительности метода используют контрольные образцы. Отрицательным контролем служат клетки или ДНК человека, не содержащие ДНК HPV, которые подверглись всем тем же манипуляциям, что и анализируемый образец. Положительный контроль — это препарат, содержащий в небольшом количестве ДНК HPV; с его помощью можно определить чувствительность метода.

2.1. Мазки и соскобы

Поскольку методы обработки образцов весьма грубые, очень важным становится состав буфера, в котором хранится образец. Идеальный буфер должен инактивировать все присутствующие в образце инфекционные агенты и в то же время не препятствовать ПЦР-амплификации ДНК. К сожалению, многие химические вещества, используемые для инактивации таких агентов, ингибируют ДНК-полимеразу *Taq*. В нашей лаборатории мы пользуемся готовым буфером, который входит в состав детектирующего набора HPV ViraPap™ (Digene Diagnostics, Inc., USA). В этом наборе содержатся реактивы для дот-блот-гибридизации образцов с радиоактивно меченными РНК-зондами, но можно приобрести отдельно пробирки для сбора образцов тканей.

Протокол 17.1. Выделение ДНК из мазков, собранных в пробирки ViraPap™

Материалы

- Пробирки ViraPap™ (Digene Diagnostics, Inc., USA)
- 5 М ацетат аммония
- 100% этанол
- Синий буфер для протеолиза из набора ViraPap™
- Буфер ТЭ: 10 мМ трис-НСl, рН 7,5, 1 мМ ЭДТА

Методика

1. К каждому образцу добавляют две капли синего буфера для протеолиза из набора ViraPap™. Инкубируют при 37 °С в течение 1 ч. После протеолиза образец можно хранить при –20 °С или обработать, как описано выше.
2. Нумеруют микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл и вносят в каждую из них 56 мкл 5 М ацетата аммония и 340 мкл 100% этанола¹⁾.
3. Пипеткой со съемным наконечником отбирают 100 мкл образца, подвергнутого протеолизу, и по каплям добавляют в пронумерованную пробирку с ацетатом аммония и этанолом. Закрывают пробирку и перемешивают ее содержимое, несколько раз перевернув пробирку.
4. Оставляют пробирку для осаждения ДНК при –20 °С на ночь или при –70 °С на 15 мин.
5. Собирают ДНК центрифугированием на микроцентрифуге при 12 000 g в течение 15 мин. Осторожно сливают супернатант, не взмучивая осадок.
6. Подсушивают осадок при 55 °С 15 мин.

Протокол 17.1 (Продолжение)

7. Суспендируют ДНК в 50 мкл ТЭ и хранят при -20°C .

8. На 100 мкл реакционной смеси для ПЦР берут 10 мкл раствора ДНК. Прежде чем открывать пробирки с образцами, непродолжительное время центрифугируют их на микроцентрифуге.

¹⁾ Смесь ацетата аммония и этанола можно приготовить заранее. Чтобы получить 80 мл смеси, берут 66,8 мл 100% этанола и 13,2 мл 5 М ацетата аммония. На 100 мкл образца нужно взять 400 мкл такой смеси.

Как видно из протокола 17.1, при хранении образцов в готовых имеющихся в продаже буферах может понадобиться осаждение ДНК спиртом. Более быстрые методы очистки, например экстракция фенолом или фильтрация, по-видимому, менее предпочтительны, поскольку требуют манипуляций, которые повышают вероятность загрязнения. Для ПЦР идеальными являются солевые или другие физиологические буферы, но клинический материал может представлять опасность как источник инфекции, поэтому приходится хранить его в буферах, содержащих вещества, инактивирующие инфекционные агенты.

2.2. Цервикально-вагинальный смыв физиологическим раствором

Материал, полученный путем цервикально-вагинального смыва, перед амплификацией нужно подвергнуть только протеолизу. Следует помнить, что такой материал подвержен ферментативной деградации, поэтому его нужно хранить в замороженном виде. Кроме того, присутствующие в нем инфекционные агенты не инактивируются, так что он представляет собой определенную опасность. Обычно в цервикально-вагинальных смывах содержится от 1 до 10 мкг ДНК. Для предотвращения их перекрестного загрязнения важно свести обработку материала в клинике к минимуму.

Описанный ниже протокол можно использовать для смывов, мазков или соскобов, хранящихся в солевом буфере. При хранении образцов в ФСБ следует учитывать, что если концентрация последнего превышает 10%, то амплификация ингибируется.

Протокол 17.2. Изготовление препаратов из смывов физиологическим раствором

Материалы

- Буфер для протеолиза: 50 mM трис-HCl, pH 8,5, 1 mM ЭДТА
- Протеиназа К: 20 мг/мл в стерильной дистиллированной воде

- 10% (о/о) Laureth-12 (Mazer Chemical, Gurney, Illinois, USA) или неионный детергент твин-20

Методика

1. Готовят 2 × раствор для протеолиза, содержащий 400 мкг/мл протеиназы К и 2% (о/о) Laureth-12 или твин-20 в буфере для протеолиза (для приготовления 0,5 мл раствора смешивают 390 мкл буфера для протеолиза, 100 мкл 10% Laureth-12 и 10 мкл протеиназы К в концентрации 20 мг/мл).
2. Разливают 2 × буфер для протеолиза по 50 мкл в пронумерованные микроцентрифужные пробирки на 1,5 мл.
3. Добавляют по 50 мкл образца в пробирки с буфером для протеолиза и инкубируют при 55 °С в течение 1 ч, затем центрифугируют непродолжительное время при 12 000 g.
4. Инактивируют протеазу, проинкубировав пробирки при 95 °С в течение 10 мин. Хранят содержимое при –20 °С.
5. На 100 мкл реакционной смеси для ПЦР берут 10 мкл образца. Перед тем как открыть пробирки, проводят их кратковременное центрифугирование в микроцентрифуге.

2.3. Ткани, заключенные в парафин

Возможность амплификации ДНК в парафинизированных тканях зависит от типа использованного фиксатора, продолжительности фиксации и сроков хранения образца [8]. ДНК в таких тканях может быть повреждена, и тогда удастся амплифицировать только небольшие ее фрагменты. Поэтому очень важно использовать внутренний контроль амплификации, который не только свидетельствует о наличии в образце ДНК человека, но позволяет судить о возможности амплификации в ней протяженных фрагментов. Чтобы преодолеть трудности, которые возникают при работе с парафинизированными тканями, мы рекомендуем обратиться к работам [8, 9] (см. также гл. 15).

Протокол 17.3. Изготовление препаратов из тканей, заключенных в парафин

Материалы

- Октан или ксилол
- 100% этанол
- Ацетон (высокой степени чистоты)
- Буфер для протеолиза: 50 мМ трис-НСl, рН 8,5, 1 мМ ЭДТА

Протокол 17.3 (Продолжение)

- 10% (о/о) Laureth-12 или неионный детергент твин-20
- Раствор протеиназы К в стерильной дистиллированной воде, 20 мг/мл

Методика

1. Перед получением срезов тщательно протирают поверхность микротом и ножа ксилолом или октаном, а затем этанолом, чтобы избежать загрязнения образцов. Приступая к работе с новым блоком, меняют перчатки.
2. Готовят срезы толщиной 10–20 мкм и с помощью стерильных зубочисток переносят каждый из них в стерильную микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл. Для контроля загрязнений чередуют исследуемые блоки и блок — отрицательный контроль (например, ткань аппендикса) (10 исследуемых блоков — 1 контроль).
3. Экстрагируют парафин из среза, поместив его в октан (1 мл) и перемешивая на встряхивателе при комнатной температуре 15–30 мин до растворения парафина.
4. Осаждают ткань центрифугированием при 12 000 g в течение 2 мин. Осторожно удаляют супернатант с помощью пипетки со съемным наконечником, не касаясь ткани. Если парафин удален не полностью, повторяют пп. 3 и 4.
5. Суспендируют осадок в 0,5 мл 100% этанола. Центрифугируют при 12 000 g 2 мин и по возможности удаляют весь этанол.
6. Добавляют 10 мкл ацетона и высушивают образец в открытых пробирках в термостате или бане при 55 °C.
7. Готовят протеолитический раствор, содержащий протеиназу К в концентрации 200 мкг/мл и 1% Laureth-12 или твин-20 в буфере для протеолиза.
8. Суспендируют осадок в 50–250 мкл (в зависимости от размеров среза) раствора для протеолиза. Инкубируют 2–3 ч при 55 °C или оставляют на ночь при 37 °C. Осаждают кратковременным центрифугированием при 12 000 g.
9. Инактивируют протеиназу прогреванием при 95 °C в течение 10 мин.
10. Перед проведением ПЦР центрифугируют пробирки ~ 1 мин. Для амплификации берут по крайней мере две разные аликвоты образца, например 1 и 10 мкл в расчете на 100 мкл реакционной смеси для ПЦР (см. протокол 17.4).

3. Амплификация

Для амплификации специфических фрагментов ДНК с помощью ПЦР используют олигонуклеотидные праймеры [10, 11] и термостабильную ДНК-полимеразу *Taq*. Цикл ПЦР включает тепловую денатурацию ДНК, отжиг праймеров и элонгацию, при этом количество синтезируемых фрагментов растет экспоненциально (гл. 15). Это позволяет амплифицировать в одной реакции менее десяти копий ДНК-мишени, т.е. метод обладает очень высокой чувствительностью и требует, чтобы препарат был совершенно свободен от чужеродной ДНК.

3.1. Предупреждение загрязнений

Вследствие чрезвычайно высокой чувствительности метода ПЦР необходимо предпринимать особые меры, чтобы избежать попадания в исследуемый препарат чужеродной ДНК [12]. Так, для уменьшения загрязнения аэрозолями, остающимся на автоматических микропипетках, при отборе образцов и реагентов нужно пользоваться съемными наконечниками. Чтобы избежать бактериального загрязнения, все реагенты для ПЦР следует готовить в УФ-дезинфицированном боксе; там же нужно проводить и амплификацию. Если работа ведется в ламинарном шкафу, то вентилятор следует выключить, поскольку поток воздуха тоже является источником бактериального загрязнения.

Все микропипетки, пипетки, сосуды, штативы для пробирок и т. д. необходимо использовать исключительно для ПЦР и хранить их в боксе или специально предназначенном для этого месте. Нельзя применять эту посуду для сбора продуктов амплификации, плазмидной ДНК или других источников возможного загрязнения. Рабочие поверхности и инструменты следует как можно чаще мыть дезинфицирующими растворами. Даже мизерные количества амплифицированных последовательностей-мишеней, попавшие в другой образец, могут свести на нет всю работу.

3.2. Амплификация гена L1 HPV и β -глобинового гена человека

В этом разделе описана процедура одновременной амплификации фрагмента гена L1 HPV (450 п.н.) и фрагмента гена β -глобина человека (268 п.н.) (протокол 17.4). Для определения целостности ДНК в парафинизированной ткани и возможности получения амплифицированных L1-продуктов длиной более 450 п.н.

параллельно можно амплифицировать еще и более протяженный фрагмент β -глобинового гена длиной 536 п.н. (протокол 17.5).

Для интерпретации полученных результатов необходимо использовать положительный и отрицательный контроли. Положительным контролем могут служить клеточные линии, полученные из HPV-содержащих раковых клеток шейки матки, например линии SiHa (одна копия ДНК HPV 16 на клетку), HeLa (10–50 копий ДНК HPV 18 на клетку), CaSki (500 копий ДНК HPV 16 на клетку). В качестве отрицательного контроля используют клеточные линии человека, заведомо не содержащие HPV, например K562.

Протокол 17.4. Одновременная амплификация гена L1 HPV и β -глобинового гена человека

Материалы

- Стерильная, полученная с помощью стеклянного дистиллятора вода
- 10 × буфер для ПЦР с ДНК-полимеразой *Taq*: 100 мМ трис-HCl, pH 8,5, 500 мМ KCl, 40 мМ MgCl₂
- Смесь dNTP: по 10 мМ dATP, dCTP, dGTP и dTTP
- ДНК-полимераза *Taq*: 5 ЕД/мкл
- Легкое минеральное (например, вазелиновое) масло
- Праймеры для ПЦР
 HPV-праймеры: по 50 мкМ MY09, MY11 (см. табл. 17.1)
 β -Глобиновые праймеры (268 п.н.): по 50 мкМ GH20, PC04 (см. табл. 17.1)

Методика

1. Готовят реакционную смесь для ПЦР, исходя из необходимого числа реакций, добавляя реагенты в следующем порядке: вода, буфер для ПЦР, раствор dNTP, ДНК-полимераза *Taq*, праймеры.
2. Для одной ПЦР нужны следующие компоненты:

- | | |
|-----------------------------|------------|
| • Образец ДНК | 1–10 мкл |
| • 10 × буфер для ПЦР | 10 мкл |
| • 10 мМ смесь dNTP | 2 мкл |
| • ДНК-полимераза <i>Taq</i> | 0,5 мкл |
| • MY09, 50 мкМ | 1 мкл |
| • MY11, 50 мкМ | 1 мкл |
| • GH20, 50 мкМ | 0,1 мкл |
| • PC04, 50 мкМ | 0,1 мкл |
| • Вода | до 100 мкл |

Каждая порция смеси для одной ПЦР содержит: 10 мМ трис- HCl , 50 мМ KCl , 4 мМ MgCl_2 , по 200 мкМ каждого из dNTP, 2,5 ЕД ДНК-полимеразы *Taq*, по 0,5 мкМ каждого из HPV-праймеров и по 50 нМ каждого из β -глобиновых праймеров.

3. В пронумерованные микроцентрифужные пробирки на 0,5 мл наливают по 100 мкл минерального масла и по 90–99 мкл реакционной смеси для ПЦР. Объем реакционной смеси может варьировать в пределах 10%, это не влияет на эффективность амплификации.
4. В последнюю очередь добавляют образец ДНК и закрывают пробирки.
5. Центрифугируют пробирки в чистой микроцентрифуге для ПЦР в течение 10 с, чтобы водный слой оказался под маслом.
6. Устанавливают следующий режим работы термоциклера¹⁾:

а. 35 циклов:	95 °С, денатурация 1 мин
	55 °С, отжиг 1 мин
	72 °С, рост цепи 1 мин
б. Рост цепи:	72 °С, 5 мин
в. Промывание:	15 °С

¹⁾ Для амплификации ДНК из парафинизированных тканей нужно 40 циклов, при росте цепи в течение 2 мин при 72 °С в каждом цикле (см. протокол 17.5).

Таблица 17.1. Праймеры, используемые для ПЦР-амплификации L1 HPV- и β -глобинового генов¹⁾

Праймер	Нуклеотидная последовательность в направлении 5' → 3'	Мишень	Цепь	Длина продукта
MY11 ²⁾	GCMCAGGGWCATAAAYAATGG	HPV L1	+	450
MY09 ²⁾	CGTCCMARRGGAWACTGATC	HPV L1	–	
GH20 ²⁾	GAAGAGCCAAGGACAGGTAC	β -Глобиновый ген	+	268
PC04 ²⁾	CAACTTCATCCACGTTCCACC	То же	–	
KM29	GGTTGGCCAATCTACTCCCAGG	То же	+	536
RS42	GCTCACTCAGTGTGGCAAAG	То же	–	

¹⁾ M: А или С; R: А или G; W: А или Т; Y: С или Т.

²⁾ Производятся фирмой Perkin Elmer-Cetus, Norwalk, Connecticut, USA.

Протокол 17.5. Амплификация протяженного фрагмента β -глобинового гена

Материалы

- Те же, что в протоколе 17.4, кроме праймеров для ПЦР
- β -Глобиновые праймеры (536 п.н.): по 100 мкМ KM29, RS42 (см. табл. 17.1)

Методика

1. При проведении ПЦР руководствуются протоколом 17.4, заменив указанные в нем праймеры на следующие:

- | | |
|-----------------|---------|
| • KM29, 100 мкМ | 0,1 мкл |
| • RS42, 100 мкМ | 0,1 мкл |

2. Устанавливают следующий режим работы термоциклера¹⁾:

- | | |
|----------------|--|
| а. 40 циклов: | 95 °С, денатурация 1 мин
55 °С, отжиг 1 мин
72 °С, рост цепи 2 мин |
| б. Рост цепи: | 72 °С, 5 мин |
| в. Промывание: | 15 °С |

¹⁾ Для амплификации ДНК из свежего клинического материала нужно 35 циклов при росте цепи в течение 1 мин при 72 °С в каждом цикле (см. протокол 17.4).

3.3. Амплификация гена E6 HPV

Эта система была разработана для амплификации более коротких фрагментов ДНК (240 п.н.) из другой области генома HPV [6]. Если при этом одновременно амплифицируется область L1, то можно еще раз подтвердить результаты типирования образцов. Кроме того, если ДНК в образце сильно деградирована, лучше амплифицировать более короткие фрагменты области E6. Амплификацию E6 для выявления HPV можно использовать в тех случаях, когда область L1 изменена или деградирована.

Система ПЦР области E6 высокоспецифична, но позволяет идентифицировать несколько более узкий спектр типов HPV. В ней используется не одна пара вырожденных праймеров, а смесь праймеров для смысловой и антисмысловой цепей ДНК, которые соответствуют одному и тому же участку в геномах HPV разных типов (табл. 17.2).

Если используется только система амплификации области Е6, необходимо в качестве внутреннего контроля провести амплификацию β -глобинового гена человека — либо в ходе той же реакции, либо параллельно. Продукты амплификации Е6 и короткого фрагмента β -глобинового гена (286 п.н.) трудно разделить с помощью гель-электрофореза, поэтому коамплификация этих областей нежелательна. Заметим, что ДНК клеток SiHa не может служить положительным контролем при амплификации Е6, поскольку последняя в этой линии клеток амплифицируется неэффективно.

Протокол 17.6. Амплификация гена Е6 HPV

Материалы

- Те же, что в протоколе 17.4, кроме праймеров для ПЦР
- Праймеры для ПЦР гена Е6 HPV: по 100 мкл WD72, WD76, WD66, WD67, WD154 (см. табл. 17.2)

Методика

1. При проведении ПЦР руководствуются протоколом 17.4, заменив указанные в нем праймеры на следующие:

- | | |
|------------------|---------|
| • WD72, 100 мкМ | 0,1 мкл |
| • WD76, 100 мкМ | 0,4 мкл |
| • WD66, 100 мкМ | 0,1 мкл |
| • WD67, 100 мкМ | 0,4 мкл |
| • WD154, 100 мкМ | 0,1 мкл |

2. Для проведения ПЦР на свежих клинических образцах руководствуются протоколом 17.4, на парафинизированных тканях — протоколом 17.5.

Таблица 17.2. Праймеры, использующиеся для ПЦР-амплификации области Е6 HPV

Праймер	Нуклеотидная последовательность в направлении 5' → 3'	Мишень	Цепь
WD72	CGGTCGGGACCGAAAACGG	HPV E6	+
WD76	CGGTTSAACCGAAAMCGG	HPV E6	+
WD66	AGCATGCGGTATACTGTCTC	HPV E6	—
WD67	WGCAWATGGAWWGCYGTCTC	HPV E6	—
WD154	TCCGTGTGGTGTGTCTCGTCC	HPV E6	--

4. Анализ ПЦР-продуктов: электрофорез

4.1. Электрофорез в полиакриламидном геле

Продукты амплификации, о которых шла речь в предыдущем разделе, варьируют по длине от 240 до 536 п.н. и их легко разделить в 5–7% полиакриламидном или в 1,5% агарозном геле (последний описан в гл. 12 и 15). Электрофорез в полиакриламидных гелях дает лучшее разрешение и обеспечивает большую чувствительность. Не следует делать вывод о наличии или отсутствии в образце HPV исходя из результатов гель-электрофореза, если не поставлен соответствующий контрольный эксперимент. Таким экспериментом может служить амплификация β -глобинового гена: если продукт амплификации этого гена обнаруживается на электрофореграмме, то данный образец пригоден для анализа. Отсутствие амплификации β -глобинового гена может быть связано с недостатком интактной ДНК или наличием какого-либо ингибитора. На ингибирование ПЦР указывает отсутствие образования димеров-праймеров. Электрофорез в полиакриламидном геле (ПАГ) описан в протоколе 17.7.

Протокол 17.7. Электрофорез ПЦР-продуктов в полиакриламидном геле

Материалы

- 7% ПАГ
- Буфер ТБЭ: 50 мМ трис-НСl, 67 мМ борная кислота, 1 мМ ЭДТА
- Бромистый этидий: 10 мг/мл в стерильной воде
- 10 × краситель для геля: бромфеноловый синий, 2,5 мг/мл, ксилолцианол, 2,5 г/мл, фиколл-400, 250 мг/мл, 0,1 М ЭДТА, рН 8,0, 0,1% ДСН
- Маркер мол. массы: 50 нг ДНК/мкл (например, рестрикционный фрагмент длиной 123 н.п.)

Методика

1. Готовят 7% бис-акриламидный гель толщиной 1 мм в буфере ТБЭ. С помощью гребенки с 10 или 14 зубьями делают в геле лунки для внесения образцов. Гель с гребенкой можно хранить до семи дней при -4°C .
2. Отбирают 5 мкл раствора с продуктами амплификации, добавляют 5 мкл 2 × красителя для геля и вносят эту смесь в лунку. В одну из лунок вносят маркер мол. массы (250–500 нг). Проводят электрофорез до тех пор, пока бромфеноловый синий не дойдет до конца геля.

3. Окрашивают гель бромистым этидием (10 мкг/мл) в течение 2 мин и фотографируют в УФ-свете, используя оранжевый фильтр.

4.2. Рестрикционный анализ L1-фрагментов HPV

Если в результате ПЦР образуется достаточно много чистого L1-продукта, то его можно разделить на порции, рестрицировать разными эндонуклеазами и получить типоспецифичные электрофореграммы [5]. Небольшие различия между ними (например, наличие или отсутствие какого-то сайта рестрикции) будут свидетельствовать скорее о вариабельности данного типа вируса, а не о наличии HPV другого типа.

Такой рестрикционный анализ можно использовать для типирования небольшого числа образцов. Кроме того, образцы, которые не гибридизуются ни с одним типоспецифичным зондом, можно классифицировать и охарактеризовать с помощью рестрикционных карт, построенных с использованием других нуклеаз. В нашей лаборатории таким методом удалось получить более 40 карт, многие из которых, по-видимому, отвечают новым типам HPV. Метод рестрикционного анализа L1-фрагментов HPV описан в протоколе 17.8.

Протокол 17.8. Рестрикционный анализ L1-фрагментов

Материалы

- Те же, что в протоколе 17.7
- 10 × буфер для *Bgl*/II: 1 М NaCl, 100 мМ MgCl₂, 100 мМ трис-HCl, pH 7,5, 100 мМ β-меркаптоэтанол
- Эндонуклеазы: *Bam*H1, *Dde*1, *Hae*III, *Hin*F1, *Pst*1, *Rsa*1, *Sau*3A1, по 4–20 ЕД/мкл
- Компоненты, необходимые для амплификации L1-гена или L1/β-глобинового гена (см. протокол 17.4)

Методика

1. Определяют объем реакционной смеси, обеспечивающий получение количества L1-продукта, достаточного для его визуализации, и увеличивают этот объем в восемь раз. Добавляют ко всему объему 12 мкл 10 × буфера для *Bgl*/II и доводят объем водой до 112 мкл; хорошо перемешивают.
2. Разливают смесь в восемь пробирок, по 14 мкл в каждую.

Протокол 17.8 (Продолжение)

3. Добавляют в семь пробирок по 1 мкл соответствующей эндонуклеазы; материал восьмой пробирки служит контролем. Хорошо перемешивают и при необходимости центрифугируют непродолжительное время на микроцентрифуге.
4. Инкубируют при 37 °С в течение 1 ч.
5. Добавляют 1,7 мкл 10 × буфера для окрашивания геля и вносят эту смесь в лунку геля. Проводят электрофорез согласно протоколу 17.7.

5. Анализ ПЦР-продуктов: дот-блот-гибридизация

Достаточно точным и специфическим методом выявления ДНК HPV является дот-блот-гибридизация. Для ее проведения образцы наносят на нейлоновые фильтры и гибридизуют либо с протяженными консервативными зондами, такими как зонд на амплифицированные гены L1, либо с олигонуклеотидными зондами, например с зондами на амплифицированные фрагменты E6 или типированные амплифицированные фрагменты L1. Вследствие высокой гомологии L1-последовательностей разных типов HPV можно выявить широкий спектр типов этих вирусов, используя смесь трех протяженных зондов, специфичных для HPV 16, 18 и 31 [7]. Консервативного зонда для генов области E6 не сконструировано, однако можно использовать смесь разных типоспецифичных олигонуклеотидных зондов.

Система ПЦР L1-HPV была создана для амплификации области генома, содержащей типоспецифичные последовательности, что позволяет проводить последующую гибридизацию с типоспецифичными зондами. Продукты амплификации области E6 также можно идентифицировать с помощью олигонуклеотидных зондов.

Зонд на β-глобиновый ген используют для проверки работы системы в целом, оценки пригодности образца для анализа и целостности дот-блотов. При этом применяются как изотопные, так и неизотопные методы детекции.

5.1. Приготовление дот-блотов

Используя дот-блоттинг для детекции ДНК, можно быстро проанализировать большое число образцов. При этом, если приготовить параллельные блоты для 80–90 ПЦР-реакций, можно провести гибридизацию с различными типоспецифичными HPV-зондами. Кроме того, эти блоты можно отмыть от зондов и ис-

пользовать их для повторной гибридизации и типирования. В протоколе 17.9 описана процедура приготовления дот-блотов амплифицированного β -глобинового гена и ДНК HPV для последующей детекции ДНК с помощью меченых зондов.

Протокол 17.9. Приготовление дот-блотов

Материалы

- Раствор для денатурации: 0,4 М NaOH, 25 мМ ЭДТА
- 20 × SSC: 0,3 М цитрат натрия, 3 М NaCl, pH 7,0
- 20 × SSPE: 3,6 М NaCl, 0,2 М фосфат Na, 0,11 М NaOH, 0,02 М ЭДТА, pH 7,4
- Нейлоновый мембранный фильтр (например, Biotrans-B, ICN, Irvine, California, USA)
- Прибор для получения дот-блотов¹⁾

Методика

1. Вырезают фильтры подходящего размера, чтобы они соответствовали размеру прибора для получения дот-блотов. Вымачивают их в дистиллированной деионизованной воде в течение 20 мин. Каждый блот должен содержать набор L1- или E6-гибридизационных контролей, среди которых — HPV-негативная ДНК человека и клонированные в плаزمиде сегменты ДНК HPV различных типов.
2. На каждые 3 мкл амплифицированного продукта, нанесенных на один блот, добавляют 100 мкл раствора для денатурации. (Например, для пяти блотов-реплик понадобится 15 мкл ПЦР-продукта и 500 мкл раствора для денатурации.) ДНК перед нанесением денатурируют не менее 10 мин.
3. В каждую ячейку вносят 100 мкл раствора денатурированной ДНК. Продукты амплификации генов E6 и L1 должны быть нанесены на разные блоты, поскольку они будут гибридизоваться с разными зондами. После нанесения всех образцов подключают вакуумный насос.
4. Хорошо промывают каждую ячейку 400 мкл 20 × SSC и снова подключают вакуумный насос. Разбирают прибор и маркируют блоты.
5. Фиксируют ДНК на фильтре с помощью УФ-лампы (например, Stratagene, La Jolla, California, USA) при мощности облучения 50 мДж/см. Можно также завернуть фильтр в пластиковую пленку и поместить на 3 мин на УФ-трансиллюминатор, использующийся для фотографирования гелей, так чтобы сторона фильтра с нанесенной ДНК была обращена к источнику излучения.

Протокол 17.9 (Продолжение)

6. Промывают фильтры в $2 \times$ SSPE и хранят при 4°C в $2 \times$ SSPE до гибридизации.

¹⁾ Дот-блоты можно готовить и вручную (см. гл. 14).

5.2. Синтез консервативных L1-зондов

Консервативные L1-зонды, с помощью которых можно идентифицировать широкий спектр типов HPV, синтезируют из ПЦР-L1-фрагментов HPV типов 16, 18 и 31 в очень сильном разведении. Для этого проводят амплификацию с участием типоспецифичных «гнездовых» праймеров (табл. 17.3), отвечающих каждому из MY09/MY11-фрагментов последовательностей L1. Эти праймеры специфичны в отношении последовательностей, локализованных внутри MY09 и MY11, так что праймерные последовательности не перекрываются с последовательностью зонда. (Отметим, что отсутствие зонда, специфичного для HPV 31, лишь немного сужает спектр выявляемых типов HPV, поэтому можно ограничиться только HPV 16- и HPV 18-зондами.)

Зонды можно пометить как с помощью ^{32}P -dNTP, так и с помощью биотина. В настоящее время в продаже имеются несколько наборов для неизотопной детекции биотинилированных зондов.

Таблица 17.3. Праймеры, использующиеся для синтеза консервативных L1-зондов

Праймер	Нуклеотидная последовательность в направлении $5' \rightarrow 3'$	Тип HPV	Цена
MY74	CATTTGTTGGGGTAACCAAC	16	+
MY75	TAGGTCTGCAGAAAACTTTC	16	—
MY76	TGTTTGCTGGCATAATCAAT	18	+
MY77	TAAGTCTAAAGAAAACTTTC	18	—
MY49	TATTTGTTGGGGCAATCAG	31	+
MY50	CTAAATCTGCAGAAAACTTT	31	—

Протокол 17.10. Синтез меченых консервативных L1-зондов

А. Изотопное мечение

Материалы

- Те же, что в протоколе 17.4, кроме праймеров

- Типоспецифичные «гнездовые» праймеры для синтеза консервативных L1-зондов: MY74, MY75, MY76, MY77, MY49, MY50, по 100 мкМ каждого (табл. 17.3)
- ПЦР-продукты L1-генов HPV 16, 18 и 31 (разведение 1:1000)
- α - ^{32}P -меченные dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 800 Ки/ммоль (NEN Dupont, Wilmington, Delaware, USA)
- Центрифужная колонка для очистки зонда
- ДНК спермы лосося

Методика

1. Всю работу по подготовке к синтезу зондов необходимо проводить в условиях, исключающих попадание в реактивы ПЦР-продуктов.
2. Проводят шесть независимых реакций, так чтобы один продукт амплификации для каждого из трех типов вирусов был помечен изотопным и неизоотопным методами. Убеждаются в том, что праймеры перемешаны с соответствующими ДНК-мишенями (табл. 17.3). Используют ту же реакцию и режим работы термоциклера, которые описаны в протоколе 17.4, но берут по 50 мкМ каждого из немеченных dNTP, 0,4 мкМ каждого праймера и 1–2 мкл соответствующего разведенного L1-продукта; доводят объем до 50 мкл. Добавляют 62,5 пмоль (50 мкКи) каждого из α - ^{32}P -dNTP.
3. Не наслаивая минерального масла, проводят 25 циклов в термоциклере, как это описано в протоколе 17.4, за исключением денатурации и отжига в течение 30 с.
4. Для проверки эффективности амплификации проводят электрофорез в присутствии бромистого этидия ПЦР-продуктов, полученных в ходе параллельной ПЦР с немечеными dNTP (протокол 17.7).
5. Очищают радиоактивно меченные фрагменты ДНК длиной 400 п.н. на колонке с сефадексом G-50 (см. гл. 13).
6. Прежде чем проводить гибридизацию, денатурируют все три фрагмента прогреванием при 95 °C в течение 10 мин в присутствии фрагментированной ДНК спермы лосося (2 мг/мл) (см. протокол 17.11).
7. Проводят гибридизацию на мембранных фильтрах со смесью зондов с удельной активностью 10^5 имп./мин на 1 мл гибридизационной смеси.

Б. Неизотопное мечение (биотинилирование)

Материалы

- Те же, что в протоколе 17.4, кроме праймеров

Протокол 17.10 (Продолжение)

- Типоспецифичные «гнездовые» праймеры для синтеза консервативных L1-зондов: MY74, MY75, MY76, MY77, MY49, MY50 по 100 мкМ каждого (см. табл. 17.3)
- ПЦР-продукты L1-генов HPV 16, 18 и 31 (разведение 1:1000)
- Bio-11-dUTP (Sigma, St. Louis, Missouri, USA)
- 5 М ацетат аммония
- Изопропанол

Методика

1. Проводят ПЦР-реакции аналогично тому, как это описано в протоколе 17.4, но при других концентрациях праймеров, магния и нуклеотидов.
2. В каждом 100 мкл реакционной смеси для одной ПЦР содержится 1–2 мкл соответствующего разведенного L1-продукта, 50 мМ KCl, 10 мМ трис-HCl, pH 8,5, 2,5 ЕД ДНК-полимеразы *Taq*, по 200 мкМ dATP, dCTP, dGTP, по 100 мкМ dTTP и bio-11-dUTP.
3. Проводят три реакции при следующих концентрациях магния и праймеров:
 - HPV 16: по 0,1 мкМ (10 пмоль) каждого из праймеров MY74, MY75, 4 мМ MgCl₂
 - HPV 18: по 0,5 мкМ (50 пмоль) каждого из праймеров MY76, MY77, 8 мМ MgCl₂
 - HPV 31: по 0,1 мкМ (10 пмоль) каждого из праймеров MY49, MY50, 6 мМ MgCl₂

Для каждой реакции готовят 10 × буфер для ПЦР или добавляют MgCl₂ в соответствующей концентрации.

4. Добавляют в пробирку 100 мкл минерального масла и проводят 25 циклов ПЦР в термоциклере, как описано в протоколе 17.4, за исключением денатурации и отжига в течение 30 с.
5. Для проверки эффективности амплификации проводят электрофорез продуктов в присутствии бромистого этидия (см. протокол 17.7). Фрагменты биотинилированной ДНК движутся в геле немного медленнее, чем небитинилированной.
6. Очищают биотинилированную ДНК, осадив ее смесью 0,4 объемов 5 М ацетата аммония и 2 объемов изопропанола [13]. Ресуспендируют меченую ДНК в буфере ТЭ.

7. Оптимальные концентрации фрагментов зондов и соотношение между ними определяют, проводя гибридизацию тестовых образцов с известными количествами ДНК HPV. При слишком высоких концентрациях зондов увеличивается фон, а при низких снижается чувствительность метода. Как чувствительность, так и отношение сигнал/шум определяются субъективно.
8. Прежде чем проводить гибридизацию, денатурируют смесь зондов прогреванием при 95 °С в присутствии фрагментированной ДНК спермы лосося (2 мг/мл) (см. протокол 17.11).

5.3. Гибридизация и детекция

После того как ПЦР-продукты иммобилизованы на мембранных фильтрах и получены меченые зонды, можно проводить гибридизацию, с тем чтобы выявить вирусную ДНК и определить тип HPV. В табл. 17.4 перечислены олигонуклеотидные зонды, специфичные для L1-генов HPV типов 6, 11, 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51 и 52 и для E6-генов HPV типов 6, 11, 16, 18, 31, 33 и 45, а также для β -глобинового гена. Типоспецифичные зонды используются в виде смесей. В таком же виде можно применять и зонды, специфичные в отношении HPV разных типов (например, HPV 6 и 11), чтобы сгруппировать типы вирусов. С появлением новых типов HPV список типоспецифичных зондов будет расширяться.

Олигонуклеотидные зонды можно пометить с помощью киназной реакции в присутствии γ - ^{32}P -АТФ (см. работу [13] и гл. 13). Удельная активность зондов составляет при этом $0.5\text{--}1.0 \times 10^7$ имп. $\cdot$ мин $^{-1}$ /пмоль. Зонды можно также биотинилировать либо присоединением биотина к концевому дезоксинуклеотиду химическим путем, либо с помощью трансферазной реакции при участии bio-dUTP (см. работу [14] и гл. 13).

В мягких условиях эти зонды гибридизуются между собой и с другими типами зондов, поскольку нуклеотидные последовательности поздних генов L1 у разных типов HPV высокомологичны. Поэтому очень важно точно измерять и поддерживать температуру, при которой отмывают фильтры. Небольшое отклонение температуры в ту или другую сторону существенно ухудшает специфичность гибридизации и чувствительность метода. В опытах по гибридизации с генами L1 используют по два олигонуклеотидных зонда для каждого типа HPV, чтобы учесть варианты, различающиеся по нуклеотидным последовательностям в одной из областей.

Для неизотопной детекции ПЦР-продуктов генов HPV и β -глобинового гена используют систему Amersham Enhanced Chemi-

Таблица 17.4. Олигонуклеотидные зонды, специфичные в отношении ПЦР-продуктов L1-, E6- и β -глобинового генов¹⁾

Зонд	Нуклеотидная последовательность в направлении 5' → 3'	Тип HPV
Зонд для L1 HPV		
MY12	GATCCGTAAC TACATCTTCCA	6
MY13	TCTGTGTCTAAATCTGCTACA	11
MY125	ACAATGAATCCYTCTGTTTTGG	6 и 11
MY95	GATATGGCAGCACATAATGAC	16
MY133	GTAACATCCCAGGCAATTG	16
WD74	GGATGCTGCACCGGCTGA	18
MY130	GGGCAATATGATGCTACCAAT	18
WD128	TTGCAAACAGTGATACTACATT	31
MY92	CCAAAAGCCYAAGGAAGATC	31
MY16	CACACAAGTAACTAGTGACAG	33
MY59	AAAAACAGTACCTCCAAAGGA	33
MY115	CTGCTGTGTCTTCTAGTGACAG	35
MY117	ATCATCTTTAGGTTTTGGTGC	35
MY89	TAGAGTCTTCCATACCTTCTAC	39
MY90	CTGTAGCTCCTCCACCATCT	39
MY98	GCACAGGATTTTGTGTAGAGG	45
MY69	ATACTACACCTCCAGAAAAGC	45
MY87	TATTAGCACTGCCACTGCTG	51
MY88	CCCAACATTTACTCCAAGTAAC	51
MY81	CACCTTCTACTGCTATAACTTGT	52
MY82	ACACACCACCTAAAGGAAAGG	52
Зонд для E6 HPV		
WD133	ACACCTAAAGGTCCTGTTTC	6
WD134	ACACTCTGCAAATTCAGTGC	11
WD103	CAACAGTTACTGCGACG	16
WD170	GCAAGACATAGAAATAA	18
WD132	GACAGTATTGGAAC TTACAG	18
WD165	AAATCCTGCAGAAAGACCTC	31
WD166	CCTACAGACGCCATGTTCA	31
RR1	G TACTGCACGACTATGT	33
RR2	ACCTTTGCAACGATCTG	33
WD171	ACAAGACGTATCTATTG	45
Зонд для β-глобинового гена		
PC03	ACACAAC TGTGTTCACTAGC	

¹⁾ Y: C или T.

Luminescence (ECL). Один из ее недостатков состоит в том, что любые пероксидазы и псевдопероксидазы, присутствующие в исследуемом образце, взаимодействуют с реактивами и дают ложноположительный гибридизационный сигнал. При работе с грубо очищенными препаратами могут возникнуть трудности, связанные с загрязнением их клетками крови. Кроме того, система детекции ECL требует использования особых мембранных фильтров, Biotex B (ICN, Irvine, California, USA).

Процедура гибридизации и детекции радиоактивных и нерадиоактивных зондов описана в протоколе 17.11.

Протокол 17.11. Гибридизация и детекция

Материалы

- Буфер для предварительной обработки фильтров: $0,1 \times$ SSPE, 0,5% ДСН
- Буфер для гибридизации с консервативными зондами: $5 \times$ SSPE, 0,1% ДСН, 100 мкг/мл одноцепочечной фрагментированной ДНК спермы лосося
- Буфер для гибридизации с олигонуклеотидными зондами: $5 \times$ SSPE, 0,1% ДСН
- Раствор для отмывания блотов: $2 \times$ SSPE, 0,1% ДСН
- Меченые ДНК-зонды (см. протокол 17.10 и табл. 17.4):
 - Смесь консервативных L1-зондов (HPV 16, 18, 31)
 - Типоспецифичные олигонуклеотидные зонды для L1
 - Типоспецифичные олигонуклеотидные зонды для E6
 - Олигонуклеотидные зонды для гена β -глобина
- Для детекции с помощью системы ECL:
 - Стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой хрена, 1 мг/мл (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA)
 - Реактивы 1 и 2 из набора ECL (Amersham, Arlington, Heights, Illinois, USA)

Методика

1. Помещают мембранные фильтры в большой объем буфера для предварительной обработки, прогретого до 65°C . Инкубируют 30 мин при слабом покачивании.
2. Складывают фильтры попарно, сторонами с нанесенной ДНК наружу, и помещают их в полиэтиленовый мешочек для гибридизации. Добавляют буфер для гибридизации (без зондов). На два фильтра площадью 100 см^2 нужно 20 мл буфера. Инкубируют при 65°C 15 мин. Для гибридизации с консервативным зондом для L1 используют буфер, содержащий ДНК спермы лосося.

Протокол 17.11 (Продолжение)

3. Перед гибридизацией смесь зондов денатурируют в присутствии 2 мг/мл ДНК спермы лосося. Вносят в микроцентрифужную пробирку на 1,5 мл нужное количество смеси зондов для L1 (см. протокол 17.10) и денатурируют при 95 °С 10 мин. Денатурированную смесь либо немедленно добавляют в прогретый буфер для гибридизации, либо быстро замораживают в смеси сухого льда и спирта. При медленном замораживании ДНК может ренатурировать, что снижает чувствительность гибридизации.
4. При гибридизации с олигонуклеотидными зондами готовят отдельные буферные растворы для гибридизации с ДНК каждого типа HPV или группы типов. Каждый из ³²P-зондов должен иметь конечную удельную активность 10⁵ имп./мин на 1 мл буфера. Концентрации биотинилированных зондов составляют 0,5 пмоль/мл для каждого из зондов.
5. Выливают буфер из мешочка, добавляют 10–20 мл буфера для гибридизации, содержащего соответствующий зонд. Удаляют крупные пузырьки воздуха, запаивают мешочек и хорошо перемешивают смесь. Проводят гибридизацию при 55 °С не менее 1,5 ч¹⁾, каждые 45 мин расправляют и переворачивают мешочки.
6. Вынимают фильтры из мешочков и быстро промывают их в буфере для отмывания фильтров, прогревом до 37–45 °С. Помещают фильтры в лоток с большим объемом буфера для отмывания, прогретого до 56 °С, и выдерживают их в течение 10 мин, постоянно покачивая лоток. Заменяют буфер и промывают еще 10 мин. Некоторые из олигонуклеотидных зондов для E6 отмывают при другой температуре: 45 °С для WD170 и WD171; 52 °С для RR1 и RR2.
7. При работе с радиоактивными зондами заворачивают фильтры в полиэтиленовую пленку и экспонируют с рентгеновской пленкой в течение ночи (гл. 12). Детекцию биотинилированных зондов осуществляют в соответствии с пп. 8–11²⁾.

А. Детекция с помощью системы ECL

8. В пластмассовый лоток наливают 250 мл раствора для отмывания фильтров, добавляют конъюгат стрептавидин—пероксида хрена до конечной концентрации 30 нг/мл в случае консервативных зондов или 40 нг/мл в случае олигонуклеотидных зондов. Осторожно перемешивают и погружают в эту смесь фильтры. Инкубируют при комнатной температуре 15 мин, осторожно покачивая лоток.

9. Сливают раствор и переносят фильтры в большой лоток, наполненный раствором для отмывания. Промывают 10 мин при сильном покачивании лотка. Заменяют раствор свежим и промывают фильтры еще раз.
10. Детектируют биотинилированный зонд с помощью системы ECL, следуя прилагаемым инструкциям фирмы-изготовителя.
11. Экспонируют фильтры с рентгеновской пленкой в течение 2 ч, затем проявляют пленку. При работе с зондами для β -глобинового гена время экспозиции составляет всего 5 мин²⁾.

¹⁾ Гибридизацию с зондами для E6 WD170 и WD171 проводят при температуре 45 °С.

²⁾ Фильтры, на которых проводилась гибридизация с консервативными зондами, нельзя использовать повторно. В отличие от этого, при гибридизации с типоспецифичными олигонуклеотидными зондами возможно повторное использование фильтров после отмывания зондов в кипящей воде или в уксусной кислоте [13]. Отмытые блоты можно хранить в 2 × SSPE при 4 °С.

6. Применение молекулярных методов в лабораторных исследованиях

Описанные выше чувствительные и универсальные методы обнаружения широкого спектра типов HPV только начинают использоваться в клинике. Прежде чем они станут одним из рутинных диагностических инструментов, необходимо установить связь между присутствием HPV в организме и возникновением патологии. Есть опасения, что необоснованное использование этих методов в целях клинической диагностики может привести к неправильному выбору способов лечения. Как нам кажется, к ним следует прибегать только в тех случаях, когда предварительные исследования указывают на их возможную прогностическую ценность. С другой стороны, сфера применения этих методов в лабораторных исследованиях уже сейчас весьма широка.

Их можно использовать в эпидемиологии для определения распространенности инфекции и факторов эпидемиологического риска в различных популяциях. По нашим данным, это снижает вероятность ошибок при классификации HPV и позволяет получить достаточно точную эпидемиологическую картину инфекции [15]. Можно также установить связь HPV-инфекций с различными клиническими проявлениями, развитием или затуханием болезни, определить типоспецифический риск заболевания. Такие исследования без сомнения полезны для диагностики заболеваний. Достаточно высокая чувствительность этих методов позволяет сравнить

различные способы подготовки образцов и выбрать тот из них, который лучше других подходит для обнаружения HPV в клинике.

Метод обнаружения HPV с помощью ПЦР используется в основном для изучения патологий шейки матки, однако он вполне пригоден для выявления HPV в других тканях. Например, его можно использовать для выяснения этиологии воспалительных процессов или рака в полости рта и урогенитальной области в тех случаях, когда причина заболевания неясна, или для исследования аногенитальных дисплазий и связанных с HPV заболеваний у людей с ослабленным иммунитетом. В будущем эти методы, по-видимому, сыграют ключевую роль в понимании этиологии и распространения HPV-инфекций. Их широкое применение сдерживается только недостаточной осведомленностью самих исследователей.

Благодарности

Мы признательны J. Sninsky и S. Williams за поддержку; сотрудникам лаборатории HPV R. Resnick, Y. Ting, D. Wright, A. Lewis, G. Eichinger за плодотворную работу; сотрудникам группы синтеза ДНК фирмы Cetus C. Levenson, D. Spasic, L. Goda, O. Budker и R. Kurka за помощь в подготовке рукописи.

Литература

1. Koutsky L. A., Galloway D. A., Holmes K. K. (1988). *Epidemiol. Rev.*, **10**, 122.
2. Roman A., Fife K. H. (1989). *Clin. Microbiol. Rev.*, **2**, 166.
3. de Villiers E.-M. (1989). *J. Virol.*, **63**, 4898.
4. Manos M. M., Ting Y., Wright D. K., Lewis A. J., Broker T. R., Wolinsky S. M. (1989). In: *Molecular diagnostics of human cancer: cancer cells* (ed. M. Fruth and M. Greaves), Vol. 7, pp. 209–214. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
5. Ting Y., Manos M. M. (1990). In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (ed. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky and T. White), pp. 356–367. Academic Press, San Diego, California.
6. Resnick R. M., Cornelissen M. T. E., Wright D. K., Eichinger G. H., Fox H. S., ter Schegget J., Manos M. M. (1990). *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1477.
7. Bauer H. M., Ting Y., Greer C. E., Chambers J. C., Tashiro C. J., Chimera J., Reingold A., Manos M. M. (1991). *J. Am. Med. Assoc.*, **265**, 472.
8. Greer C. E., Peterson S. L., Kiviat N., Manos M. M. (1991). *Am. J. Clin. Pathol.*, **95**, 117.
9. Wright D. K., Manos M. M. (1990). In: *PCR protocols: a guide to methods and applications* (ed. M. Innis, D. Gelfand, J. Sninsky and T. White), pp. 356–367. Academic Press, San Diego, California.
10. Mullis K. B., Faloona F. A. (1987). *Methods in enzymology*, Vol. 155 (ed. R. Wu), pp. 335–350. Academic Press, New York.

11. *Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. E., Arnheim N.* (1985). *Science*, **230**, 1350.
12. *Kwok S., Higuchi R.* (1989). *Nature*, **339**, 237.
13. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* (ed). (1982). *Molecular cloning, a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. [Имеется перевод: Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. — М.: Мир, 1984].
14. *Cook A. F., Vuocolo E., Brakel C. L.* (1988). *Nucleic Acids Res.*, **16**, 4007.
15. *Ley C., Bauer H. M., Reingold A., Schiffman M. H., Chambers J. C., Tashiro C. J., Manos M. M.* (1991). *J. Natl. Cancer Inst.*, **83**, 997.

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ СКРИНИНГА ВИРУСОВ ПАПИЛЛОМЫ ЧЕЛОВЕКА ПРИ ЦИТОПАТОЛОГИЯХ ШЕЙКИ МАТКИ

*Ян М. М. Валбомерс, Питер У. Дж. Мелкерт,
Адриан Дж. Ван ден Брюль, Питер Дж. Ф. Снейдерс,
Крис Дж. Л. М. Мейер*

1. Введение

Цитологическое исследование мазков шейки матки, впервые предложенное Папаниколау, представляет собой наиболее распространенный метод скрининга рака шейки матки. Применение этого так называемого Рар-метода ограничивается по ряду причин, например возможностью ошибок при взятии мазков в клинике или при микроскопическом исследовании. Поэтому возникла необходимость в более точных и быстрых методах диагностики. Согласно Рар-классификации, цитологические аномалии в мазках делятся на несколько типов: Рар I и Рар II — значительные морфологические изменения; Рар IIIa — слабая или средняя дисплазия; Рар IIIb — сильная дисплазия; Рар IV — рак *in situ*; Рар V — инвазивный рак. В настоящее время лечению подвергаются все пациентки с цитологическими аномалиями шейки матки, хотя во многих случаях в этом нет нужды: как показали некоторые исследования, только у 10–30% женщин с дисплазией Рар III или Рар IV развивается инвазивный рак шейки матки [1–3]. Однако для более точного прогнозирования клинического исхода патологических изменений шейки матки у отдельных женщин требуются дополнительные обследования.

Как показывают результаты изучения вирусной этиологии опухолей, важную роль в развитии шейки матки играют вирусы папилломы человека (HPV) [4, 5]. Обычно доброкачественные опухоли шейки матки бывают связаны с HP 6 и 11, которые называют неонкогенными, и риск развития рака при этом невысок. HPV 16, 18 и в меньшей степени HPV 31, 33, 35 обнаруживаются главным образом при слабых и сильных дисплазиях и раке шейки матки и считаются онкогенными, с высоким риском заболевания раком [6–12].

В настоящее время выделено 60 различных типов HPV, 24 из которых связано со слизистой гениталий [13]. Поскольку HPV нельзя культивировать *in vitro*, а типоспецифичные антитела, необходимые для иммуноцитохимии, отсутствуют, типы HPV в мазках приходится определять путем идентификации вирусных нуклеиновых кислот. Наиболее чувствительным методом обнаружения ДНК HPV сегодня является полимеразная цепная реакция (ПЦР) [14, 15]. Теоретически с помощью ПЦР можно выявить в данном образце ткани всего одну копию последовательности-мишени. Наша группа разработала чувствительный метод ПЦР, который можно использовать для исследования большого числа мазков с нормальной и аномальной цитологией [16–20]. Это позволило расширить наши знания о роли HPV в развитии рака шейки матки и оценить возможности, которые дает выявление HPV для диагностики предраковых или раковых патологических изменений шейки матки. В данной главе обсуждаются:

- а) изготовление препаратов для ПЦР;
- б) выявление HPV в соскобах с шейки матки;
- в) клинические аспекты: возможное применение ПЦР для скрининга рака шейки матки.

2. Изготовление препаратов для ПЦР

Соскобы берут из патологически измененной части шейки матки; для получения высококачественных мазков рекомендуется пользоваться щеткой Cervex (O. P. Bleker, личное сообщение). Первый мазок используют для рутинного цитологического анализа. Для выявления HPV материал, оставшийся на щетке от первого соскоба, а также материал, полученный при втором соскобе, помещают в 5 мл стерильного ФСБ с 0,05% мертиолатом. Подробное описание изготовления препаратов см. в протоколе 18.1. Важнейшее преимущество, которое дает использование ПЦР в крупномасштабных программах скрининга, — возможность избежать трудоемкого выделения ДНК. Уже описано проведение ПЦР непосредственно на отдельных клетках [21] или в клеточных суспензиях [22]. Если клетки инкубировали с протеиназой К [21, 23] или подвергали кислотному гидролизу с последующей нейтрализацией [24], то воспроизводимых результатов получить не удавалось. Стабильную успешную амплификацию последовательностей-мишеней HPV обеспечивало замораживание—оттаивание материала до его внесения в среду для ПЦР. Эффективность амплификации после такой обработки близка к эффективности

ПЦР, проведенной на очищенной ДНК соскобов, содержащих, как было предварительно установлено, HPV 16, 18 и 33 [19].

Протокол 18.1. Изготовление препаратов для ПЦР¹⁾

Материалы

- ФСБ: 10 мМ фосфат натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,2
- Щетки Cervex (фирмы International Medical Products, Zutphen, The Netherlands)
- 10 мМ трис-HCl, pH 8,1

Методика

1. Помещают соскобы в 5 мл стерильного ФСБ, содержащего 0,05% мертиолат, и интенсивно встряхивают.
2. Удаляют щетки стерильным пинцетом (периодически прогревая его).
3. Осаждают клетки центрифугированием при 3000 g в течение 10 мин.
4. Микропипеткой со съемным наконечником (фирмы Sarstedt) суспендируют осадок в 1 мл 10 мМ трис-HCl, pH 8,1.
5. Отбирают четыре аликвоты по 10 мкл для ПЦР²⁾ и хранят их, а также оставшийся материал, при -70 °C.
6. Для каждой ПЦР размораживают по одной аликвоте.
7. Денатурируют аликвоту при 100 °C в течение 5 мин, затем охлаждают во льду и центрифугируют при 3 000 g 1 мин.
8. Добавляют нужное количество смеси для ПЦР (протокол 18.2).

¹⁾ Все процедуры, за исключением центрифугирования, следует выполнять в ламинарном шкафу.

²⁾ Рекомендуется использовать пробирки с завинчивающимися крышками фирмы Sarstedt, а также микропипетки со съемными наконечниками фирм Microman, Gibson, France.

3. Выявление вируса папилломы человека в соскобах с шейки матки

3.1. Консервативные и типоспецифичные праймеры

Поскольку метод ПЦР оказался самым чувствительным методом выявления ДНК HPV в соскобах с шейки матки [17, 24], была начата разработка новой быстрой и доступной процедуры скрининга HPV на его основе. Следовало создать такую методику, которая позволяла бы выявлять одновременно разные типы HPV.

В соответствии с этим были выбраны праймеры, специфичные в отношении консервативных нуклеотидных последовательностей HPV разных типов. Сравнение [25] секвенированных последовательностей HPV 6b, 11, 16, 18, 31 и 33 показало, что наиболее консервативные участки локализованы в пределах открытых рамок считывания (ORF) E1 и L1 [26]. В ORF L1 были обнаружены две высококонсервативные последовательности длиной по 20 п.н., общие для всех секвенированных типов HPV; их и можно использовать в качестве консервативных праймеров для ПЦР (general primer, GP5/6; табл. 18.1) [16]. Они гибридизуются с ДНК HPV разных типов, так что отжиг можно проводить в мягких условиях. Оптимизация режима ПЦР для консервативных праймеров (GP-ПЦР) описана в работе [16]. Последовательности, распознаваемые этими праймерами во всех исследованных ДНК HPV, охватывает участок длиной 140–150 п.н. Поскольку ко времени подбора праймеров были секвенированы ДНК всего шести типов генитальных HPV, их общие свойства можно было установить только при помощи ПЦР-анализа обширной группы клонированных ДНК HPV. Как видно из рис. 18.1, А, помимо секвенированных ДНК HPV типов 6b, 11, 16, 18, 31 и 33, праймер GP 5/6 гибридизовался и давал ПЦР-продукты длиной 140–150 п.н. с несеквенированными ДНК HPV 13, 30, 32, 39 и 45. GP 5/6-праймеры не давали амплификацию ДНК pBR322, что свидетельствовало об HPV-специфичности ПЦР-продуктов и о том, что они не являются результатом перекрестной гибридизации с векторными последовательностями. Об этом говорили и результаты блот-гибридизации в мягких условиях со смесью зондов, состоящей из амплифицированных последовательностей, специфичных для HPV 6, 11, 16, 18, 31 и 33: были выявлены все фрагменты длиной 140–150 п.н. (рис. 18.1, Б). Специфичность этих ПЦР-продуктов была подтверждена также результатами дот-блот-гибридизации с *RsaI*-фрагментами [16] и данными секвенирования. Кроме того, эмпирически установлено, что если число несоответствий между праймером и мишенью больше трех, то амплификация не идет. Такому числу нуклеотидов отвечает от 0,1 до 1 фг ДНК pHPV, или 7–70 вирусных геномов [16].

Было также показано, что с помощью пары праймеров GP 5/6 можно амплифицировать разные последовательности-мишени HPV в мазках. Однако при этом в продуктах амплификации обнаруживается много фрагментов клеточной ДНК. Наличие таких коамплифицированных продуктов требует подтверждения присутствия HPV с помощью гибридизации. Праймеры, специфич-

**Таблица 18.1. Консервативные праймеры для выявления HPV,
инфицирующих гениталии**

GP 5 5' TTTGTTACTGTGGTAGATAC 3'		GP 6 3' ACTAAATGTCAAATAAAAAG 5'		Число различающихся нуклеотидов	
				GP 5	GP 6
HPV 6b			T.....	0	1
HPV 11				0	0
HPV 16	T..T.....			2	0
HPV 18			C.....	0	1
HPV 31			T.....T.....	0	2
HPV 33			...G.....C.....	0	2

Соответствие между нуклеотидными последовательностями праймеров GP5 и GP6 и последовательностями L1 ORF секвенированных типов HPV, инфицирующих гениталии. Точками обозначены совпадающие нуклеотиды, буквами — различающиеся.

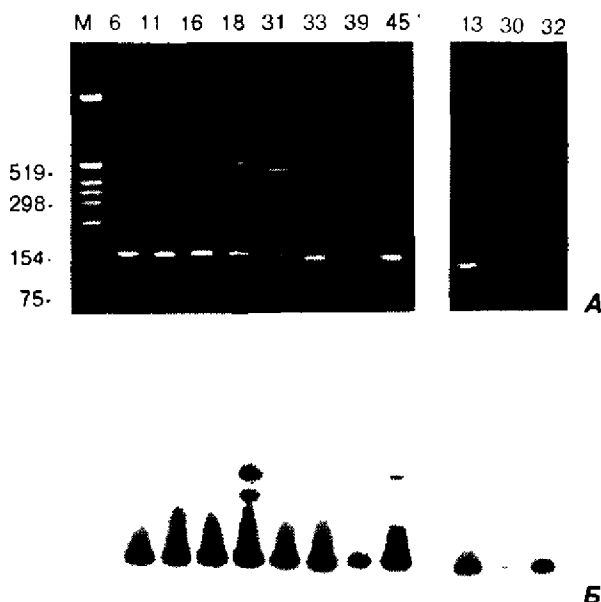


Рис. 18.1. А. Результат ПЦР 1 нг рHPV нескольких типов. Использовался праймер GP 5/6, отжиг проводился в условиях средней жесткости в присутствии 3,5 мМ Mg^{2+} . Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в присутствии бромистого этидия; фотография сделана в УФ-свете. Дорожка М — фрагменты рВR322 (ВР), полученные после рестрикции с помощью *Hinf*I. Б. Блот-гибридизация в мягких условиях ($T_m - 33^\circ C$) с ^{32}P -GP-ПЦР-продуктами амплификации HPV 6, 11, 16, 18, 31 и 33.

ные для HPV 6, 11, 16, 18, 31 и 33, были выбраны потому, что нуклеотидные последовательности ДНК этих типов вирусов уже были установлены. Отбор праймеров проводили так, чтобы можно было дифференцировать разные типы HPV по длине соответствующих ПЦР-продуктов [17].

3.2. Стратегия скрининга HPV

С разработкой прямой ПЦР (без выделения ДНК) появилась возможность создания новой стратегии скрининга [19]. Эта стратегия схематически представлена на рис. 18.2. Использование праймеров GP 5/6 позволяет в ходе одной реакции провести скрининг широкого спектра типов HPV, а то и всех генитальных HPV. После такого предварительного скрининга секвенированные HPV

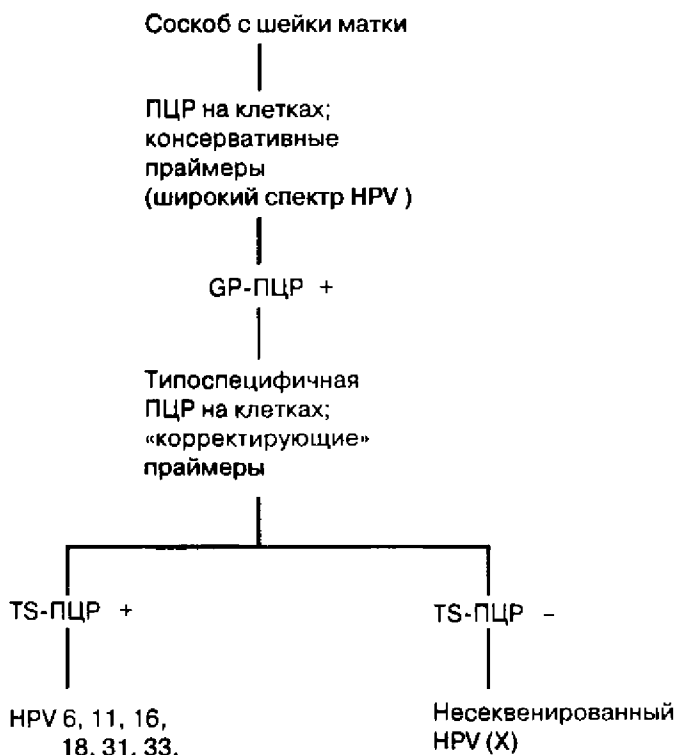


Рис. 18.2. Стратегия скрининга HPV в соскобах с шейки матки с помощью GP/TS-ПЦР.

можно идентифицировать с помощью ПЦР при участии типоспецифичных (TS) зондов (TS-ПЦР). Результаты GP-ПЦР (см. протокол 18.2) с использованием GP 5/6-праймеров и неочищенных клеточных экстрактов из 40 соскобов представлены на рис. 18.3. На рис. 18.3, А показаны результаты гель-электрофореза амплифицированных продуктов. Отчетливо видны многочисленные полосы почти на всех дорожках. После гибридизации в мягких условиях (протокол 18.4), обеспечивающих гибридизацию смеси зондов с широким спектром типов HPV (протокол 18.5), наблюдаются слабые и интенсивные полосы (рис. 18.3, Б). Материал этих полос использовался затем для проведения типоспецифичных ПЦР.

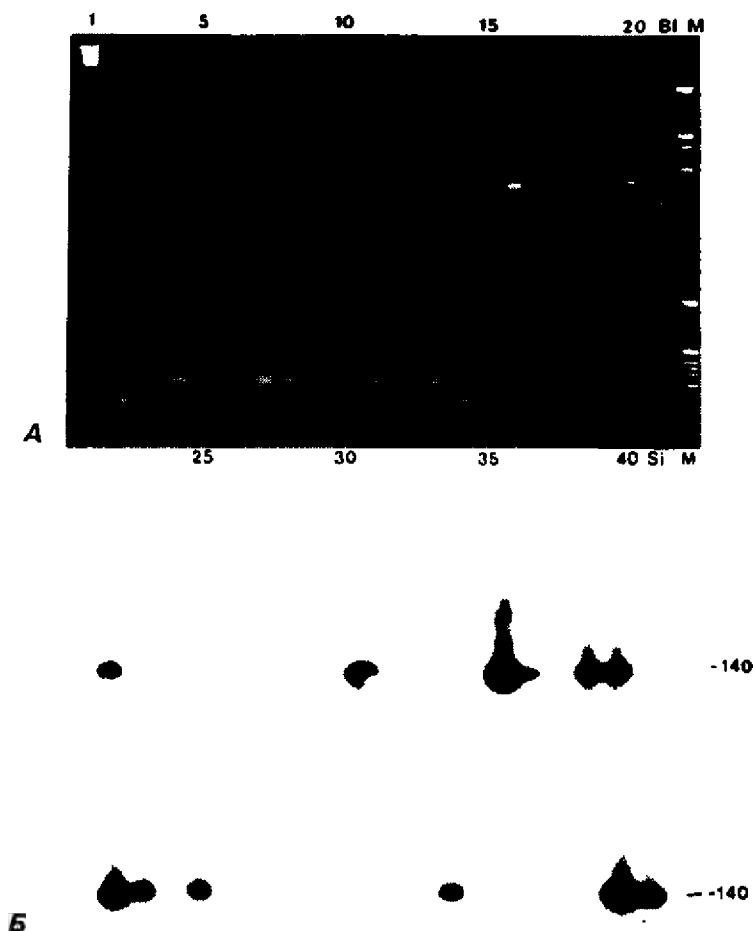


Рис. 18.3. Выявление HPV в соскобах с шейки матки с помощью прямой ПЦР. **А.** Неочищенную клеточную суспензию, полученную из соскобов 1–40, исследовали с помощью ГР-ПЦР. Продукты амплификации разделяли с помощью электрофореза в 1,5% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Положительный контроль (SI): 10^3 клеток SiHa, содержащих 1–10 копий HPV 16; отрицательный контроль (B1): дистиллированная вода. **Б.** Блот-гибридизация в мягких условиях продуктов ГР-ПЦР с мечеными последовательностями клонированных HPV 6, 11, 16, 18, 31 и 33, амплифицированными с помощью ГР-ПЦР. Фильтры отмывали в мягких условиях.

Таблица 18.2. Типоспецифичные праймеры и зонды

Типоспецифичные праймеры			Длина амплифицированной последовательности, п.п.
HPV 6.1:	+5'	TAGTGGGGCCTATGGCTCGTC 3'	280
HPV 6.2:	-5'	TCCATTAGCCTCCACGGGTG 3'	
HPV 11.1:	+5'	GGAATACATGCGCCATGTGG 3'	
HPV 11.2:	-5'	CGAGCAGACGTCCGTCTCTCG 3'	360
HPV 16.1:	+5'	TGCTAGTGCTTATGCAGCAA 3'	
HPV 16.2:	-5'	ATTTACTGCAACATTGGTAC 3'	
HPV 18.1:	+5'	AAGGATGCTGCACCGGCTGA 3'	152
HPV 18.2:	-5'	CACGCACACGCTTGGCAGGT 3'	
HPV 31.1:	+5'	ATGGTGATGTACACAACACC 3'	
HPV 31.2:	-5'	GTAGTTGCAGGACAACCTGAC 3'	514
HPV33.1:	+5'	ATGATAGATGATGTAACGCC 3'	
HPV 33.2:	-5'	GCACACTCCATGCGTATCAG 3'	
PCO3 ¹⁾ :	+5'	ACACAACCTGTGTTCACTAGC 3'	455
PCO4 ¹⁾ :	-5'	CAACTTCATCCACGTTCAAC 3'	

Типоспецифичные олигонуклеотидные зонды

HPV 6:	+5'	CATTAACGCAGGGGGCGCCTGAAATTGTGCC 3'
HPV 11:	+5'	CGCCTCCACCAAATGGTACACTGGAGGATA 3'
HPV 16:	+5'	GCAAACCACCTATAGGGGAACACTGGGGCA 3'
HPV 18:	+5'	TGGTTCAGGCTGGATTGCGTCGCAAGCCCA 3'
HPV 31:	+5'	ACCTGCGCCTTGGGCACCAGTGAAGGTGTG 3'
HPV 33:	+5'	CAAATGCAGGCACAGACTCTAGATGGCCAT 3'

¹⁾ PCO3 и PCO4 — праймеры для гена β -глобина [6].

Протокол 18.2. Полимеразная цепная реакция на мазках шейки матки с использованием консервативных праймеров (GP-ПЦР)

Материалы

- 10 × раствор для GP-ПЦР: 500 мМ KCl, 100 мМ трис-HCl, pH 8,3, 35 мМ MgCl₂, 0,1% желатина
- Раствор dNTP: по 2 мМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP
- ДНК-полимераза *AmpliTaq*: 5 ЕД/мкл (фирмы Perkin-Elmer Cetus, USA)
- Праймеры GP5 и GP6: по 100 пмоль/мкл (см. табл. 18.1)

Методика

1. Готовят смесь для 100 ПЦР, добавляя в пробирку на льду следующие компоненты в указанном порядке:

• Дистиллированная вода	2930 мкл
• 10 × раствор для GP-ПЦР	500 мкл
• Раствор dNTP	500 мкл
• GP5	25 мкл
• GP6	25 мкл
• ДНК-полимераза <i>AmpliTaq</i>	20 мкл

2. Добавляют 40 мкл смеси для ПЦР к 10 мкл неочищенного клеточного экстракта (см. протокол 18.1).
3. Добавляют несколько капель (~ 100 мкл) минерального масла
4. Проводят денатурацию прогреванием смеси при 95 °C в течение 4 мин и выполняют 40 циклов амплификации в термоциклере (фирмы Biomed, Amstelstad, The Netherland или аналогичном). Каждый цикл включает: денатурацию при 95 °C в течение 1 мин, отжиг при 40 °C в течение 2 мин, элонгацию при 72 °C в течение 1,5 мин. Элонгация в последнем цикле идет на 4 мин дольше.
5. Отбирают 10 мкл ПЦР-продукта для электрофореза в 1,5% агарозном геле с трис-боратным буфером и бромистым этидием (см. гл. 12 и 15).

Результаты TS-ПЦР (см. протокол 18.3) образцов, отобранных после GP-ПЦР, показаны на рис. 18.4. Для тестов использовали смесь праймеров, специфичных в отношении HPV 6, 16, 33 и HPV 11, 18 и 31. После Саузерн-блоттинга и гибридизации с олигонуклеотидными зондами, специфичными для HPV 6, 16, 33 и HPV 11, 18 и 31 (протокол 18.4), можно определить тип HPV, основываясь на величине гибридизационного сигнала и длине амплифицированных фрагментов. Из 14 GP-ПЦР-положительных соскобов 7 оказались TS-ПЦР-положительными: в четырех из них обнаружен HPV 16, в трех других — HPV 18, HPV 31 и HPV 6, по одному типу в каждом. Все эти соскобы после GP-ПЦР обнаруживали интенсивную гибридизацию, при этом четыре из них оказались TS-ПЦР-негативными. Это указывает на присутствие в них пока не секвенированных или новых типов HPV, HPVX. Несекуенированные типы HPV можно идентифицировать методом дот-блот-гибридизации, используя в качестве зондов известные клонированные, но не секвенированные последовательности HPV [18]. Новые типы HPV можно идентифицировать с помощью секвенирования (гл. 16) и клонирования.

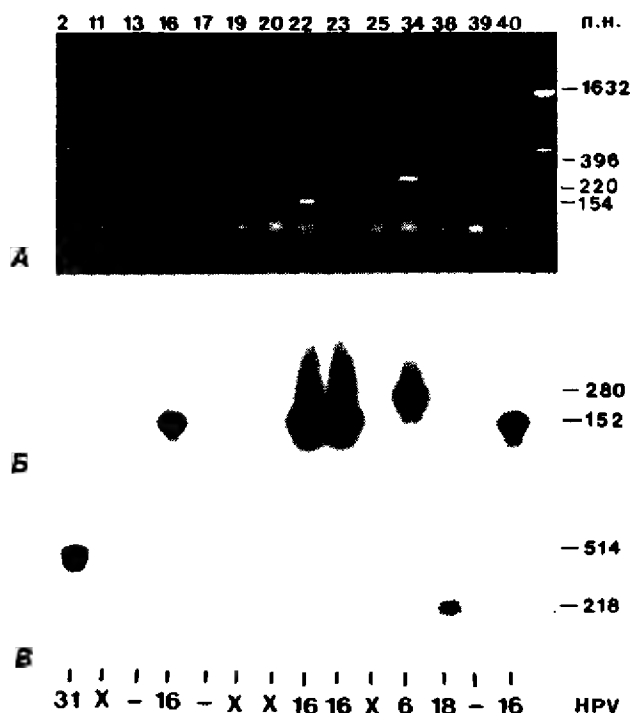


Рис. 18.4. А. GP-ПЦР-положительные и вызывающие подозрение соскобы исследовали с помощью TS-ПЦР, используя смесь HPV 6-, 11-, 16-, 18-, 31- и 33-специфичных праймеров. Представлены TS-ПЦР-продукты после электрофореза в 1,5% агарозном геле и окрашивания бромистым этидием. Б. Блот-гибридизация TS-ПЦР-продуктов с мечеными HPV 6- и 33-специфичными олигонуклеотидными зондами. В. Блот-гибридизация с мечеными HPV 11-, 18- и 31-специфичными олигонуклеотидными зондами. Дорожка М — фрагменты pBR322, рестрицированной *Hinf*I.

Протокол 18.3. Типоспецифичная ПЦР (TS-ПЦР) на мазках шейки матки

Материалы

- 10 × раствор для TS-ПЦР: 500 мМ KCl, 100 мМ трис-HCl, pH 8,3, 15 мМ MgCl₂, 0,1% желатина
- Раствор dNTP: по 2 мМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP
- ДНК-полимераза *AmpliTaq*. 5 ЕД/мкл (Perkin-Elmer, Cetus, USA)

- Праймеры, специфичные для HPV 6, 11, 16, 18, 31 и 33: по 100 пмоль/мкл каждого (табл. 18.2)

Методика

Готовят две разные многокомпонентные среды для ПЦР, содержащие олигонуклеотидные праймеры, специфичные для HPV 6, 16, 33 и HPV 11, 18, 31 соответственно (табл. 18.2).

1. Готовят две ПЦР-смеси, рассчитанные на 100 ПЦР-реакций каждая.

Смесь для HPV 6, 16, 33:

- | | |
|--|----------|
| • Дистиллированная вода | 2830 мкл |
| • 10 × раствор для TS-ПЦР | 500 мкл |
| • Раствор dNTP | 500 мкл |
| • Каждый из праймеров для HPV 6.1, 6.2, 16.1, 16.2, 33.1, 33.2 | 25 мкл |
| • ДНК-полимераза <i>AmpliTaq</i> | 20 мкл |

Смесь для HPV 11, 18, 31 готовят так же, как первую, но вместо праймеров для HPV 6, 16 используют праймеры для HPV 11, 18.

2. К 10 мкл неочищенного клеточного экстракта добавляют 40 мкл смеси для ПЦР (см. протокол 18.1).
3. Добавляют несколько капель (100 мкл) минерального масла.
4. После 4-минутной денатурации при 95 °C в течение 4 мин проводят 40 циклов амплификации в термоциклере (фирмы Biomed, Amstelstad, The Netherlands или аналогичном). Каждый цикл включает денатурацию при 95 °C в течение 1 мин, отжиг при 40 °C в течение 2 мин, элонгацию при 72 °C в течение 1,5 мин. Элонгация в последнем цикле идет на 4 мин дольше.
5. Отбирают 10 мкл ПЦР-продукта для электрофореза в 1,5% агарозном геле с трис-боратным буфером и бромистым этидием (см. гл. 12 и 15).

Протокол 18.4. Блот-гибридизация

Описанную ниже блот-гибридизацию можно успешно проводить на заряженных нейлоновых фильтрах BioTrace RP (фирмы Gelman Science) и GenScreen Plus (фирмы NEN DuPont).

Материалы

- Предгибридизационная смесь: для приготовления 1 л смеси берут 248 мл дистиллированной воды, 500 мл 0,5 М Na_2HPO_4 , pH которого доведен до 7,4 фосфорной кислотой, 350 мл 20% ДСН и 2 мл 0,5 М ЭДТА, pH 8,0

Протокол 18.4 (Продолжение)

- Буфер для переноса: 0,6 М NaCl/0,4 М NaOH
- 20 × SSC: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0
- 2 × SSC, 0,2 М трис-HCl, pH 7,5
- Меченый зонд (см. протоколы 18.5 и 18.6)
- 3 × SSC, 0,5% ДСН

Методика

А. Блоттинг

Никакой предварительной обработки геля не требуется.

1. Готовят все необходимое для блоттинга, используя в качестве буфера для переноса 0,6 М NaCl/0,4 М NaOH (см. рис. 14.1).
2. Погружают фильтр на 10 мин в дистиллированную воду, затем помещают его на гель для переноса.
3. Проводят перенос в течение ночи, затем погружают фильтр на 15 мин в 2 × SSC/0,2 М трис-HCl; все это время слегка покачивают ванночку с раствором.
4. Помещают фильтр между двумя листами фильтровальной бумаги и хорошо высушивают. Никакой дополнительной обработки фильтров перед гибридизацией не требуется.

Б. Гибридизация

1. Вымачивают фильтры в прогретой до 55 °С предгибризационной смеси не менее 15 мин, покачивая ванночку.
2. Добавляют ДНК, меченную радиоактивным изотопом, и оставляют на ночь при 55 °С, покачивая ванночку.
3. Трижды по 15–20 мин промывают фильтры в 100–200 мл 3 × SSC/0,5% ДСН.
4. Помещают фильтры на фильтровальную бумагу, не высушивая их до конца во избежание необратимого связывания зонда.
5. Чтобы фильтры оставались влажными, заворачивают их в пленку Saran®.
6. Проводят радиоавтографию с усиливающими экранами при –70 °С в течение ночи (гл. 14).

Протокол 18.5. Мечение зондов для ГР-ПЦР (см. также гл. 13)

Материалы

- 5 × смесь для мечения олигонуклеотидов: на 500 мкл требуется 100 мкл раствора А, 250 мкл раствора В и 150 мкл раствора С.

Раствор А:	1,25 М трис-НCl, 1,25 М MgCl ₂ , pH 8,0	1 мл
	β-Меркаптоэтанол	18 мкл
	dTTP (100 мМ)	5 мкл
	dGTP (100 мМ)	5 мкл
	dATP (100 мМ)	5 мкл

Раствор В: 2 М HEPES, pH 6,6

Раствор С: гексануклеотиды (90 ОД на 1 мл ТЭ)

До использования хранить при -20 °C

- [α-³²P]-dCTP: активность 3000 Ки/ммоль (например, фирмы NEN DuPont)
- Буфер ТЭ: 10 мМ трис-НCl, pH 7,5, 1 мМ ЭДТА
- Легкоплавкая агароза (фирмы BioRad)
- Сефадекс G-50
- Фрагмент Кленова ДНК-полимеразы I

Методика

1. Проводят GP-ПЦР (см. протокол 18.2) по отдельности для клонированных в плаزمидях ДНК HPV 6, 11, 16, 18, 31 и 33; каждой из ДНК берут по 1 нг.
2. Разделяют ПЦР-продукты с помощью электрофореза в 1% легкоплавком агарозном геле (см. гл. 14 и протокол 16.1).
3. Безопасной бритвой вырезают из геля полоски, где сконцентрированы фрагменты ДНК длиной 140–150 п.н., стараясь захватить как можно меньше геля.
4. Помещают в одну пробирку равные количества этих фрагментов, происходящих из разных HPV.
5. Выдерживают пробирку в течение 10 мин в водяной бане на 65 °C, чтобы расплавить агарозу, при сильном встряхивании.
6. Хранят пробирку при -20 °C.
7. Размораживают содержимое пробирки при 65 °C, добавляют 4 мкл этой смеси к 12 мкл дистиллированной воды и денатурируют кипячением в течение 5 мин.
8. Не допуская затвердения агарозы, быстро добавляют в указанном порядке следующие компоненты:

• 5 × смесь для мечения олигонуклеотидов	5 мкл
• [α- ³² P]-dCTP: активность 3000 Ки/ммоль	2 мкл
• Фрагмент Кленова ДНК полимеразы I	1 мкл
9. Инкубируют при 37 °C 30–60 мин.
10. Добавляют 100 мкл ТЭ, перемешивают и помещают на 10 мин в баню на 65 °C.

Протокол 18.5 (Продолжение)

11. Для отделения меченого зонда от свободных нуклеотидов изготавливают колонку с сефадексом G-50.
12. Для этого силиконизированную пастеровскую пипетку объемом 3,5 мл набивают сефадексом G-50.
13. Уравновешивают колонку буфером ТЭ и наносят зонд.
14. Пропускают через колонку пять раз по 200 мкл ТЭ, собирая каждую фракцию элюата в отдельную пробирку.
15. Определяют радиоактивность содержимого каждой пробирки с помощью портативного счетчика.
16. Объединяют содержимое двух последних пробирок, отличающееся обычно высокой концентрацией меченого зонда, очищенного от свободных нуклеотидов.
17. Денатурируют зонд кипячением в течение 5 мин и вносят его в предгибризационную смесь (см. протокол 18.4).

Протокол 18.6. 5'-концевое мечение TS-ПЦР-зондов

Материалы

- 10 × киназный буфер: 500 мМ трис-НСl, рН 7,6, 100 мМ MgCl₂, 50 мМ ДТТ, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ спермидин
- Типоспецифичные олигонуклеотидные зонды: по 10 мкл зондов для HPV 6, 11, 16, 18, 31 и 33 (см. табл. 18.2)
- [γ -³²P]-dATP: активность 300 Ки/ммоль (например, фирмы NEN DuPont)
- Полинуклеотидкиназа фага T4

Методика

1. Смешивают следующие компоненты.

• Типоспецифичные олигонуклеотидные зонды	по 1 мкл
• 10 × киназный буфер	2 мкл
• Bidest	9 мкл
• [γ - ³² P]-dATP	3 мкл
• Полинуклеотидкиназа фага T4	1 мкл

Доводят объем дистиллированной водой до 20 мкл

2. Инкубируют не менее 30 мин при 37 °С.
3. Фильтруют содержимое пробирки через колонку с сефадексом G-50, как описано в протоколе 18.5 (при этом прогревание до 65 °С и конечный этап денатурации можно опустить).
4. Вносят зонд в предгибризационную смесь (см. протокол 18.4).

Слабые GP-ПЦР-гибридизационные сигналы могут возникать в результате неспецифического спаривания праймеров с клеточной ДНК, и их не следует рассматривать как указание на наличие новых HPV. Вывод об обнаружении новых типов HPV можно сделать только при наличии позитивных GP-ПЦР-продуктов, дающих сильные гибридизационные сигналы (по сравнению с сигналом на 100 клетках линии SiHa), и отсутствии TS-ПЦР-продуктов. Правильность такой интерпретации была подтверждена результатами секвенирования амплифицированных продуктов (van den Brule et al., в печати). Чтобы уменьшить риск получения ложноотрицательных результатов, мы периодически отбираем случайным образом группу соскобов и проводим ПЦР, используя β -глобинспецифичные праймеры (см. табл. 18.2) как внутренний контроль на возможность амплификации ДНК-мишени (см. также гл. 15 и 17). По нашим данным, полученным после ПЦР и электрофореза, β -глобин-негативными оказываются менее 0,1% соскобов, что говорит о достаточно высоком — с точки зрения возможности проведения ПЦР — качестве мазков. Прямой ПЦР-анализ занимает очень мало времени: 120 образцов можно амплифицировать всего за 2 ч. Таким образом, за неделю один лаборант может провести ПЦР-анализ 500 образцов. Предобработка материала не влияет на скорость анализа, ее можно повысить за счет сокращения продолжительности гибридизации и радиоавтографии. Применение неизотопных методов детекции продуктов ПЦР и автоматизация соответствующих процедур позволят еще больше расширить применение ПЦР для рутинного скрининга HPV в соскобах с шейки матки.

Несмотря на то что две важнейшие проблемы применения ПЦР для массового скрининга — использование неочищенной ДНК и обнаружение еще не секвенированных типов HPV — удалось разрешить, не следует забывать о некоторых других трудностях, как, например, загрязнение материала (см. гл. 15 и 17).

3.3. Некоторые замечания, касающиеся скрининга HPV

За последнее время описаны методы ПЦР с использованием консервативных («консенсусных») праймеров, специфичных в отношении генов E1 [18, 27] и L1 [16, 23] HPV. Поскольку секвенированные геномы HPV гомологичны не более чем по 12 последовательным нуклеотидам, для обеспечения эффективной амплификации широкого спектра HPV необходимо «адаптировать» либо праймеры, либо методику проведения ПЦР. К числу таких

«адаптаций» относятся: допустимость определенного несоответствия между праймерами и ДНК-мишенью, т. е. снижение жесткости условий отжига (см. [16] и данную главу); использование вырожденных праймеров (смеси олигонуклеотидов, различающихся по некоторым позициям), что обеспечивает их комплементарность ДНК НРV 6, 11, 16, 18 и 33 (см. гл. 17); использование праймеров, содержащих в некоторых позициях остатки инозина [27]. «Консенсусная» ПЦР с использованием праймеров МУ 09/11, описанная в работе [23] (см. также гл. 17), была успешно применена для анализа клинических образцов [28, 29]. Однако сравнение результатов амплификации НРV 16 с использованием GP 5/6 с результатами, полученными в рамках исходного протокола для МУ 09/11 [23], когда проводится 30 циклов ПЦР и используется консервативный олигонуклеотидный зонд, показало, что в последнем случае чувствительность метода по крайней мере в 10 раз ниже. Возможно, это обусловлено различиями в числе циклов амплификации (40 циклов против 30) и в размерах используемых зондов (смесь полноразмерных продуктов амплификации и консервативный олигонуклеотидный зонд). Недавно метод с использованием праймеров МУ 09/11 был модифицирован: увеличено число циклов амплификации и использована смесь ПЦР-продуктов, полученных путем амплификации нескольких клонированных и неизвестных последовательностей ДНК НРV [29]. Однако мы отдаем предпочтение ПЦР с использованием GP 5/6, поскольку при этом в результате амплификации получают более короткие последовательности (150 п.н. против 450 п.н.), которые больше подходят для анализа неочищенных клеточных суспензий. Чтобы можно было получать согласованные результаты о преобладании в мазках НРV того или иного типа, желательно наладить между лабораториями, использующими для выявления НРV стандартный ПЦР-метод, обмен соскобами.

Основной недостаток метода ПЦР, являющийся обратной стороной его достоинства, — высокая чувствительность. При минимальном загрязнении мазков в клиниках или лабораториях посторонними ДНК, клонированными плазмидами или ПЦР-продуктами может быть получен ложноположительный результат. Чтобы предотвратить получение такого результата вследствие того, что в препарате присутствует плаزمид с клонированной в ней ДНК НРV (рНРV), используют «корректирующие» праймеры, фланкирующие сайты, по которым клонирован НРV (рис. 18.5). Это позволяет обнаруживать специфические НРV-последовательности в клиническом материале даже на фоне рНРV [17]. На наш взгляд, наиболее серьезный источник загрязнения — это сами

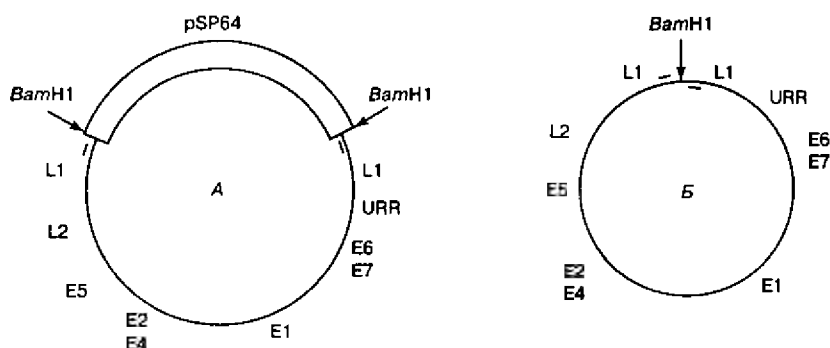


Рис. 18.5. Получение «корректирующих» праймеров. Стрелками показаны праймеры, фланкирующие уникальный *Bam*HI-сайт и инициирующие амплификацию фрагмента pSP64 длиной 3 т.п.н. (А) или фрагмента клонированной в эписоме ДНК HPV длиной 200 п.н. (Б). Условия типоспецифичной ПЦР оптимальны для клонирования фрагментов ДНК длиной до 500 п.н. Е — ранние гены, L — поздние.

продукты амплификации, что заставило нас готовить препараты и растворы для ПЦР и проводить электрофорез в трех изолированных комнатах (см. гл. 15 и 17). Необходимо также на всех этапах пользоваться одноразовыми пробирками и пипетками со съемными наконечниками (см. протокол 18.1). При проведении ПЦР непосредственно на клиническом материале предварительная обработка образцов сводится к минимуму. Учитывая это и все сказанное выше, имеет смысл проводить прямую GP/TS-ПЦР, обеспечивающую минимальный риск загрязнения образцов.

4. Клинические аспекты

4.1. Частота обнаружения HPV в препаратах

Как показали эпидемиологические исследования, частота обнаружения разных типов HPV в образцах сильно зависит от используемого метода выявления вируса, от состава обследуемых групп пациенток и т. д. [30]. Для определения встречаемости HPV в мазках вполне подходит метод GP/TS-ПЦР. Ван ден Брюль и др. [20] использовали его для обследования двух групп пациенток:

- 1) женщины 30–35 лет без симптомов какого-либо заболевания, живущие в регионе, для которого характерна низкая частота заболеваемости раком шейки матки, и проходящие каждые три года соответствующее обследование;

- 2) женщины 16–60 лет, обратившиеся в клинику по поводу различных гинекологических нарушений, связанных или не связанных с патологией шейки матки.

Данные по встречаемости HPV, полученные при независимом цитологическом исследовании мазков и выявлении HPV методом ПЦР, сильно различались. На рис. 18.6 приведены результаты исследования нормальных в цитологическом отношении соскобов, взятых у женщин без каких-либо симптомов (А-I; 3,5%), у пациенток без видимой патологии шейки матки (В-II; 9%) и у пациенток с патологией шейки матки (С-II; 21,5%). Встречаемость HPV 16 и 18 в этих группах составила 0,9% (А), 2,5% (В) и 12% (С) соответственно. У женщин из второй группы

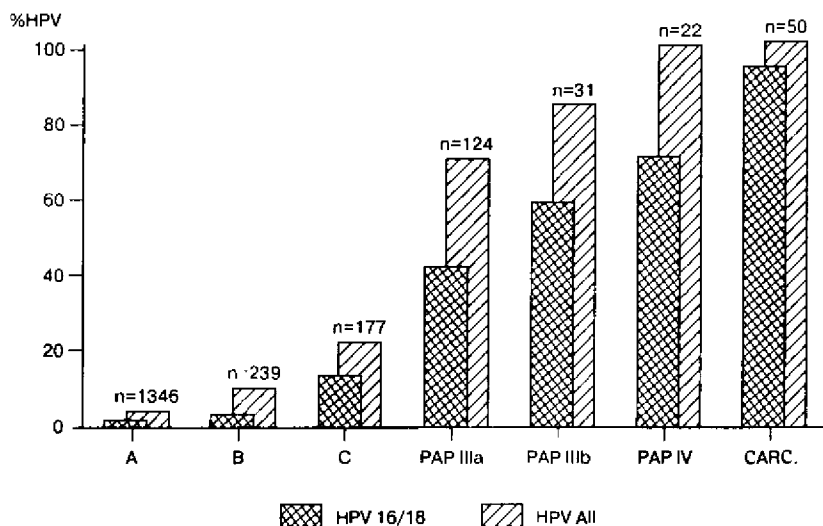


Рис. 18.6. HPV-позитивность и ее корреляция с результатами цитологического анализа мазков шейки матки и тканевых срезов опухолей шейки матки (Carc). Суммарную позитивность (HPV All), включая и позитивность по несеквенированным геномам HPV, определяли с помощью ГР-ПЦР, а позитивность по HPV типов 16 и 18 выявляли с помощью типоспецифичной ПЦР. На наличие HPV проверяли нормальные в цитологическом отношении соскобы (Pap I, II), взятые у женщин из групп А, В и С (см. текст), а также аномальные соскобы (Pap IIIa, IIIb и IV). ДНК HPV была обнаружена в неочищенной суспензии клеток из мазков шейки матки и в препаратах ДНК, выделенной из образцов тканей плоскоклеточной карциномы [37].

78% мазков содержали HPV 16 и 18, что было связано с интра-эпителиальной неоплазией шейки матки 1–3 степени. Отсюда следует, что женщинам, в мазках которых при отсутствии цитологических аномалий обнаружены онкогенные типы HPV, необходимо наблюдаться в клинике. Такая практика введена в нашей больнице. В мазках со слабой и сильной дисплазией и в мазках от пациенток с подозрением на рак *in situ* из обеих групп суммарная встречаемость HPV всех типов составила 70, 84 и 100% соответственно. Во всех случаях плоскоклеточной карциномы шейки матки (n=50) в мазках был обнаружен HPV. Встречаемость HPV 16 и 18 составляла 41% при слабой дисплазии и увеличивалась до 94% при разных формах рака.

4.2. Перспективы выявления и цитологического скрининга HPV

HPV обнаружены во всех описанных на сегодняшний день случаях инвазивных опухолей и рака *in situ* (рис. 18.6). Таким образом, HPV может служить маркером злокачественных клеток. Вирус обнаружен в 70% мазков, взятых у женщин с дисплазией, и лишь в 3,5% мазков с нормальной цитологией. Наличие HPV в мазках указывает на повышенный риск развития рака шейки матки. Выявление потенциально онкогенных типов HPV с помощью GP/TS-ПЦР позволит прогнозировать новообразования, которые могут перерасти в инвазивные опухоли. Сейчас в нашей клинике проводят проверку этой гипотезы на обширном клиническом материале. Возможно, скринингом HPV удастся заменить широкомасштабные цитологические исследования аномальных клеток у женщин старше 35 лет из группы риска. Это позволит проводить последующий цитологический анализ для выявления аномальных клеток только тем женщинам, в мазках которых обнаружен HPV. Многих женщин с дисплазией, у которых HPV не обнаруживается, не придется подвергать гинекологическому обследованию.

Предварительные результаты длительных исследований, проводимых в нашей лаборатории, позволяют предполагать, что развитие рака шейки матки всегда связано с присутствием в клетках HPV, в основном типов 16 и 18. Описанный в этой главе скрининг HPV, по-видимому, более надежен и занимает меньше времени, чем цитологический анализ мазков. Поэтому результаты клинических лабораторных исследований могут в недалеком будущем приобрести большое значение для разработки методов скрининга рака шейки матки.

Благодарности

Мы хотели бы поблагодарить мисс Yvonne Duiker и миссис Carla van Rijn за прекрасную подготовку рукописи, а также д-ра P. van der Valk за критические замечания. Клонированные типы HPV, использованные в данной работе, любезно предоставили д-ра E. M. de Villiers, H. zur Hausen, L. Gissmann (Heidelberg, Germany), A. Lorincz (Gaithersburg, Maryland, USA), K. Shah (Baltimore), G. Nuovo (New York) и G. Orth (Paris, France). Данную работу частично субсидировали Dutch Cancer Society Koningen Wilhelmina Fonds: Grants IKA-VU-89-16; IKA-VU-91-17, и Prevention Fund, The Netherland, Grant 28-1502.2.

Литература

1. Richart R. M., Barron B. A. (1981). *Cancer*, **47**, 1176.
2. Campion H. J., Cuzick J., McCance D. J., Singer A. (1986). *Lancet*, **2**, 237.
3. Koss L. G. (1989). *J. Am. Med. Assoc.*, **261**, 737.
4. Gissmann L., Schneider A. (1986). Herpes and papilloma viruses (ed. G. De Palo, F. Rilke, H. zur Hausen), pp. 15–25. New York Serzona Symposia Publications. Raven Press, New York.
5. zur Hausen H. (1989). *Cancer Res.*, **49**, 4677.
6. Gissmann L., Wolnik L., Ikenberg H., Koldowsky H., Schnurch G. G., zur Hausen H. (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 560.
7. Lorincz A. T., Lancaster W. D., Kurman R. J., Bennett Jenson A., Temple G. F. (1986). In: *Viral etiology of cervical cancer* (ed. by R. Peto and zur Hausen), p. 225. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
8. Lorincz A. T., Lancaster W. D., Temple G. F. (1986). *J. Virol.*, **58**, 225.
9. McCance D. J., Campion M. J., Clarkson P. K., Chesters P. M., Jenkins D., Singer A. (1985). *Br. J. Obstet. Gynaecol.*, **92**, 1101.
10. Boshart M., Gissmann L., Ikenberg H., Kleinheinz A., Scheurlen W., zur Hausen H. (1984). *EMBO J.*, **3**, 1151.
11. Dürst M., Gissmann L., Ikenberg H., zur Hausen H. (1983). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 3812.
12. Beaudenon S., Kremsdorf D., Croissant O., Jablonska S., Wain-Hobson S., Orth G. (1986). *Nature*, **321**, 246.
13. De Villiers E. M. (1989). *J. Virol.*, **63**, 4898.
14. Saiki R. K., Scharf S., Faloona F., F. Mullis K. B., Horn G. T., Erlich H. A., Arnheim N. (1985). *Science*, **230**, 1350.
15. Saiki R. K., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S., Higuchi R., Horn G. T., F. Mullis K. B., Erlich H. A. (1988). *Science*, **239**, 487.
16. Snijders P. J. F., van den Brule A. J. C., Schrijnemakers H. F. J., Snow G., Meijer C. J. L. M., Walboomers J. M. M. (1990). *J. Gen. Virol.*, **71**, 173.
17. van den Brule A. J. C., Claas H. C. J., du Maine M., Melchers W. J. G., Helmerhorst T., Quint W. G. V., Lindeman J., Meijer C. J. L. M., Walboomers J. M. M. (1991). *J. Med. Virol.*, **29**, 20.

18. van den Brule A. J. C., Snijders P. J. F., Gordijn R. L. J., Bleker O. P., Meijer C. J. L. M., Walboomers J. M. M. (1990). *Int. J. Cancer*, **45**, 644.
19. van den Brule A. J. C., Meijer C. J. L. M., Kenemans P., Walboomers J. M. M. (1990). *J. Clin. Microbiol.*, **28**, 2739.
20. van den Brule A. J. C., Walboomers J. M. M., du Maine M., Kenemans P., Meijer C. J. L. M. (1991). *Int. J. Cancer*, **48**, 404.
21. Li H., Gyllensten U. B., Cui X., Saiki R. K., Erlich H. A., Arnheim N. (1988). *Nature*, **335**, 414.
22. Kogan S. G., Doherty M., Gitschier J. (1987). *New Engl. J. Med.*, **317**, 985.
23. Manos M. M., Ting Y., Wright D. K., Lewis A. J., Broker T. R., Wolinsky S. M. (1989). *Cancer Cells*, **7**, 209.
24. Melchers W., van den Brule A., Walboomers J., de Bruin M., Herbrink P., Meijer C., Lindeman J., Quint W. (1989). *J. Med. Virol.*, **27**, 329.
25. Queen C., Korn L. J. (1984). *Nucleic Acids Res.*, **12**, 581.
26. Giri I., Danos O. (1986). *Trends in Genet.*, **2**, 227.
27. Gregoire L., Arella M., Camplone-Piccardo J., Lancaster W. D. (1989). *J. Clin. Microbiol.*, **27**, 2660.
28. Resnick R. M., Cornelissen M. T. E., Wright D. K., Eichinger G. H., Fox H. S., ter Schegget J., Danos M. M. (1990). *J. Natl. Cancer Inst.*, **82**, 1477.
29. Bauer H. M., Ting Y. I., Greer C. E., Chambers J. C., Tashiro C. J., Chimera J., Reingold A., Manos M. (1991). *JAMA*, **265**, 472.
30. Munoz N., Bosch X., Kaldor J. M. (1988). *Br. J. Cancer*, **57**, 1.
31. Schwarz E., Durst M., Demankowski C., Lattermann O., Zech R., Wolfsperger E., Suhai S., zur Hausen H. (1983). *EMBO J.*, **2**, 2341.
32. Dartmann K., Schwarz E., Gissmann L., zur Hausen H. (1986). *Virol.*, **151**, 124.
33. Seedorf K., Krammer G., Durst M., Suhai S., Rowekamp W. G. (1985). *Virol.*, **145**, 181.
34. Cole S. T., Danos O. (1987). *J. Mol. Biol.*, **193**, 599.
35. Goldsborough M. D., Di-Silvestre D., Temple G. F., Lorincz A. T. (1989). *Virol.*, **171**, 306.
36. Cole S. T., Streeck R. (1986). *J. Virol.*, **58**, 991.
37. Walboomers J. M. M., Melchers W. J. G., Mullink H., Meijer C. J. L. M., Struyk A., Quint W. G. J., van der Noordaa J., ter Schegget J. (1988). *Am. J. Pathol.*, **131**, 587.

ОБНАРУЖЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ПАТОГЕННЫХ МИКРООРГАНИЗМОВ МОЛЕКУЛЯРНЫМИ МЕТОДАМИ

Брюс Дж. Маккреди, Джозеф А. Чимера

1. Введение

За последние десять лет появилось много литературных данных об использовании ДНК-зондов в качестве диагностического инструмента в клинических лабораториях (см. обзоры [1, 2]). Поскольку геном каждого микроорганизма содержит уникальные видоспецифичные нуклеотидные последовательности, подобрав к ним соответствующие зонды, можно идентифицировать любой из патогенов. Это позволяет выявить микроорганизмы, которые трудно обнаружить с помощью культивирования, а кроме того, приводит к экономии времени и средств, затрачиваемых на выделение инфекционных агентов.

В основе молекулярных методов лежит высокая специфичность комплементарного спаривания двух молекул ДНК: зонда и мишени (ДНК патогенного микроорганизма). Сначала двухцепочечную молекулу ДНК патогена денатурируют нагреванием или с помощью химических агентов. Затем берут нуклеиновую кислоту-зонд, комплементарную специфическому участку ДНК (или РНК) мишени, и проводят их гибридизацию. При этом зонд предварительно метят с помощью радиоактивных изотопов, ферментов или других лигандов, например биотина (гл. 13). В результате комплементарного спаривания зонда и последовательности-мишени образуются двухцепочечные дуплексы, которые затем детектируют тем или иным способом. Нуклеиновая кислота-мишень может быть фиксирована на твердой подложке, находиться в растворе, в интактной клетке или ткани (*in situ*) (гл. 13). В зависимости от типа исследуемой ткани, выявляемого патогена и характера зонда применяют разные способы гибридизации, обеспечивающие максимальную чувствительность метода и надежность детекции.

2. Конструирование и выбор зондов

Зонды для обнаружения патогенных организмов могут иметь разное происхождение, но в любом случае они должны быть специфичны в отношении генетического материала тех микроорганизмов, которые предполагается обнаружить. Для этого — в зависимости от поставленной задачи — создают видоспецифичные зонды или зонды, комплементарные уникальным последовательностям в геноме данного патогена. Зонд может представлять собой относительно протяженный участок (10^2 – 10^4 п. н.) геномной ДНК, полученный клонированием фрагментов генома патогенного организма. Протяженные зонды для одноцепочечных нуклеиновых кислот можно получить с помощью транскрипции *in vitro*, в результате которой образуются высокоспецифичные РНК-зонды (гл.13). В клинических лабораториях широко используют синтетические олиго-зонды длиной 12–100 нуклеотидов, которые синтезируют химическим путем, используя в качестве матрицы одноцепочечные ДНК. Часто такие зонды, предназначенные для обнаружения специфических патогенов, можно приобрести на фирмах. Гибридизация с короткими олигонуклеотидными зондами более специфична, чем с протяженными, и осуществляется быстрее, однако ее чувствительность ниже, поскольку в короткий зонд можно включить не так много молекул-свидетелей (меток). Чувствительность гибридизации с олигонуклеотидными зондами позволяют существенно повысить системы амплификации. Итак, при выборе зондов следует учитывать несколько факторов: наличие готовых препаратов или возможность синтеза олигонуклеотидных зондов самостоятельно, чувствительность и специфичность детекции, тип молекул-свидетелей, условия гибридизации. Различные методы гибридизации, выбор и мечение зондов, выбор метки подробно описаны в предыдущих главах и в работе [3].

3. Обнаружение патогенных микроорганизмов кишечной группы методом гибридизации на колониях

Миллионы людей в развивающихся странах ежегодно погибают от кишечных инфекций, сопровождающихся диареей. Возбудителями таких инфекций могут быть различные вирусы и бактерии, и их точная идентификация очень важна для назначения правильного лечения. Некоторые кишечные патогенные микроорганизмы, например продуцирующие энтеротоксин

Escherichia coli, вызывают гиперсекрецию в клетках кишечного эпителия. Другие патогенные бактерии, например некоторые виды *Shigella*, вызывают бактериальную дизентерию, разрушая эпителиальные клетки толстой кишки. Обычно патогенные организмы идентифицируют с помощью посева кала больного и последующего биохимического и иммунологического анализа. Патогенные и непатогенные штаммы *E. coli* дифференцируют с помощью специфических антисывороток и культуральных методов с постановкой теста на токсичность. Если же использовать для обнаружения этих патогенов молекулярные методы, проводя гибридизацию на культурах, выращенных в селективной среде, или непосредственно на образцах кала, то время и стоимость анализа можно резко снизить.

3.1. Подготовка образцов для гибридизации

В протоколе 19.1 описана процедура переноса колоний с селективной среды на нейлоновые и нитроцеллюлозные фильтры, последующий лизис клеток и фиксация высвободившейся ДНК на фильтрах. Она представляет собой модификацию метода, представленного в работе [4].

Протокол 19.1. Перенос колоний с селективной среды на твердую подложку

Материалы

- 10% ДСН
- Раствор для денатурации: 0,5 М NaOH, 1,5 М NaCl
- Буфер для нейтрализации: 0,5 М трис-HCl, pH 8,0, 1,5 М NaCl

Методика

1. Переносят образец кала или ректального мазка на чашки с агаром Макконки и Гектена¹⁾. Переворачивают чашки и инкубируют их при 37 °С в течение 12–24 ч., периодически проверяя рост колоний.
2. Помещают на поверхность питательного агара²⁾ нейлоновый или нитроцеллюлозный фильтр диаметром 82 мм (работают в перчатках).
3. Переносят колонии с селективной среды на фильтр, пользуясь стерильной зубочисткой или петлей для пересева. При переносе на фильтр делают небольшие штрихи, стараясь размещать колонии по отдельности.

4. Отдельно на тот же фильтр переносят колонии позитивных и негативных (нетоксичных) контрольных клеток из ночных культур. Тщательно маркируют эти штаммы на фильтре с помощью несмываемых чернил или отверстий, проделанных в фильтре иглой № 20. Позитивные контрольные клетки содержат нуклеотидную последовательность, к которой специфичен используемый зонд (фрагмент гена, кодирующего токсин), в негативных контрольных клетках эта последовательность отсутствует.
5. Переворачивают чашки и инкубируют их при 37 °С в течение 12 ч.
6. С помощью пинцета с тупыми концами снимают фильтр с агара и кладут его на 3–4 листа фильтровальной бумаги (ватман 3 ММ), предварительно вымоченных в 10% ДСН в течение 5 мин (фильтр должен быть обращен вверх стороной, на которую нанесены колонии).
7. Удаляют с фильтра избыток жидкости, промокнув бумагой, и переносят его на вторую стопку фильтровальной бумаги ватман 3 ММ, вымоченной в течение 5 мин в растворе для денатурации.
8. Переносят фильтр на бумагу ватман 3 ММ, вымоченную в течение 5 мин в буфере для нейтрализации.
9. Переносят фильтр на сухой лист ватмана 3 ММ и высушивают его при комнатной температуре или при 37 °С в течение 30–60 мин.
10. Помещают фильтр между двумя листами ватмана 3 ММ и кладут эту стопку между двумя стеклянными пластинами. Выдерживают в вакуумном термостате при 80 °С в течение 2 ч. Чтобы фиксировать денатурированную нуклеиновую кислоту на фильтре, помещают его на несколько минут под УФ-свет (например, лампы Stratalinker, Stratagene, Inc.). По нашим данным, этот метод дает хорошие результаты при работе с заряженными нейловыми фильтрами, но не с нитроцеллюлозными. Фильтры можно использовать для гибридизации сразу же или хранить завернутыми в алюминиевую фольгу под вакуумом при комнатной температуре.

¹⁾ Для выявления патогенных микроорганизмов можно использовать сами образцы кала (впрочем, этот метод менее чувствителен). В этом случае помещают небольшое количество образца на нейлоновый или нитроцеллюлозный фильтр и кладут фильтр на питательный агар. После инкубации при 37 °С в течение 24 ч колонии готовят к гибридизации, как это описано в пп. 6–10.

²⁾ Приготовление чашек с селективной и неселективной средами описано в работе [5].

3.2. Гибридизация нуклеиновых кислот, фиксированных на нитроцеллюлозных или нейлоновых фильтрах, с ДНК-зондами, мечеными ферментами

Условия, при которых гибридизация протекает оптимальным образом, зависят от свойств зонда: короткий он или длинный, одно- или двухцепочечный и т. д. Способы детекции гибридизовавшегося зонда также различаются и зависят от типа молекул-свидетелей, связанных с зондом. Все эти вопросы подробно рассматриваются в многочисленных обзорах. В протоколе 19.2 описана процедура гибридизации с короткими олигонуклеотидными зондами, к которым ковалентно приштампана щелочная фосфатаза. Такие зонды можно приготовить способом, описанным в работе [6], или получить в готовом виде в составе наборов (поставляемых, например, фирмой Cambridge Research Biochemicals, UK).

Протокол 19.2. Гибридизация нуклеиновых кислот, иммобилизованных на фильтрах, с ДНК-зондами, мечеными щелочной фосфатазой (ЩФ), и детектирование метки путем преципитации красителя

Материалы

- Предгибризационный буфер: 5 × SSC, 1% (о/о) ДСН, 0,5% (в/о) БСА, 0,5% (в/о) поливинилпирролидон
- 20 × SSC: 3 М NaCl, 0,3 М цитрат натрия, pH 7,0
- Буфер для промывания: 0,1 М трис-HCl, pH 8,5
- Нитросиний тетразолий (НСТ): маточный раствор (75 мг/мл) в 70% диметилформамиде (ДМФ)
- 5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (БХИФ): маточный раствор (50 мг/мл) в ДМФ
- Субстратный буфер: 0,1 М трис-HCl, 0,1 М NaCl, 50 мМ MgCl₂, pH 8,5

Методика

1. Помещают фильтры с фиксированными на них нуклеиновыми кислотами-мишенями (см. протокол 19.1) в пластиковые мешочки, запаивают их и инкубируют фильтры в предгибризационном буфере при 50 °C 15 мин. Используют такое количество буфера, чтобы он покрывал свободно плавающий фильтр (примерно 100–200 мкл/см²).

2. Срезают угол мешочка и сливают буфер. Добавляют порцию свежего буфера, содержащего 50 нг ДНК-зонда, меченного ЩФ. Вновь используют такой объем гибридизационного буфера, чтобы он покрывал фильтр. Запаивают мешочек и инкубируют фильтр при 50 °C 15–30 мин.
3. Промывают фильтры в двух сменах по 10 мл смеси 1 × SSC и 1% ДСН при 50 °C, по 5 мин в каждой смене.
4. Промывают фильтры в 1 × SSC без детергента в течение 5 мин (ДСН и другие детергенты могут помешать осаждению красителя).
5. Окрашивают фильтры в растворе, содержащем 0,33 мг/мл НСТ, 0,17 мг/мл БХИФ в буфере для субстрата, при комнатной температуре до полного окрашивания (обычно этот процесс занимает 1 ч).

После окрашивания те места на фильтре, где локализованы колонии, окрашиваются в пурпурный цвет. Чтобы различить действительно позитивные образцы от негативных, сравнивают окрашивание нанесенных на этот же фильтр негативных и позитивных контрольных колоний. Обычно наблюдается небольшое фоновое окрашивание, которое можно отличить от слабого окрашивания позитивных образцов, сравнив его с окрашиванием негативных контрольных колоний.

4. Обнаружение патогенных микроорганизмов в клинических образцах с помощью ПЦР

Возможность быстрой диагностики инфекционных заболеваний путем прямого скрининга ограничивается отсутствием достаточно чувствительных методов детекции. Молекулярно-биологические методы, основанные на использовании для обнаружения патогенных микроорганизмов специфических зондов, имеют ряд преимуществ перед классическими методами культивирования *in vitro* с последующим биохимическим и серологическим тестированием. Однако, хотя они и не требуют применения биохимических и иммунологических методов, их чувствительности тоже недостаточно для прямой идентификации микроорганизмов в таких сложных клинических образцах, как кал или моча. Чувствительности и специфичности, необходимых для обнаружения экзогенных нуклеотидных последовательностей непосредственно в клинических образцах, можно достичь, если перед гибридизацией с зондами провести ПЦР-амплификацию. Это позволяет получить за несколько

часов миллионы копий искомой последовательности-мишени. С помощью ПЦР можно амплифицировать и обнаружить всего одну молекулу ДНК на фоне огромного числа молекул геномной ДНК, присутствующих в образце [7]. Имеются данные об обнаружении патогенных микроорганизмов с помощью ПЦР и последующей гибридизации непосредственно в клинических образцах [8, 9, 10]; одна из таких методик описана в протоколе 19.3. Обзор методов, в которых используется ПЦР в клинических и научно-исследовательских целях, дан в работе [11], а также в гл. 15, 17, 18, 20 и 21.

Протокол 19.3. Применение ПЦР для обнаружения патогенных микроорганизмов в клинических образцах

Материалы

- Среда для переноса: 0,02 М фосфатный буфер, pH 7,2, содержащий 0,2 М сахарозу, 10% сыворотку плода коровы, инактивированную нагреванием, гентамицин в концентрации 25 мкг/мл и амфотерицин В в концентрации 2,5 мкг/мл
- Рестрикционный буфер: 50 мМ трис-НСl, pH 8,5, 1 мМ ЭДТА, 1% (о/о) ДСН, протеиназа К, 200 мкг/мл
- Легкое минеральное масло
- Буфер для ПЦР: 10 мМ трис-НСl, pH 8,3, нагретый до 25 °С, 50 мМ КСl, 2,5 мМ MgCl₂, 0,01% желатина, по 200 мкМ каждого из трифосфатов: dATP, dCTP, dTTP, dGTP

Методика

1. Такие клинические образцы, как мазки шейки матки или уретры, либо пробы мочи, полученные в пределах 24 ч, помещают прямо в среду для переноса. Кал предварительно размельчают в физиологическом растворе, например в ФСБ (10 мМ фосфат натрия, 150 мМ NaCl, pH 7,4), так чтобы конечная концентрация составляла 200–250 мг/мл.
2. Осаждают нерастворимые частицы низкоскоростным центрифугированием (200 g, 5 мин). Сливают 0,5 мл светлой надосадочной жидкости и осаждают бактерии центрифугированием при 12 000 g в течение 1 мин. Ресуспенсируют осадок в 100 мкл рестрикционного буфера¹⁾.
3. Встряхивают пробирки на вортексе, чтобы диспергировать осадок, и инкубируют в течение 1 ч при 55 °С.
4. Инактивируют протеиназу К, проинкубировав образцы при 95 °С в течение 10 мин. Кратковременно (2 с) центрифугируют на микроцентрифуге.

5. Маркируют пробирки для ПЦР объемом 0,5 мл (Perkin—Elmer Cetus) и добавляют в каждую из них 75 мкл легкого минерального масла. Затем добавляют по 100 мкл 1 × буфера для ПЦР, содержащего по 0,2 мкМ каждого из праймеров и 2,5 ЕД на 100 мкл ДНК-полимеразы *Taq* (Amplitaq, Perkin—Elmer Cetus)²⁾.
6. В каждую из пробирок добавляют по 1—10 мкл образца (п. 4). Перемешивают и центрифугируют 10 с на микроцентрифуге, чтобы водная фаза оказалась под слоем масла.
7. Помещают пробирки в автоматический термоциклер (например, Perkin—Elmer Cetus, Norwich, Connecticut, USA) и проводят 30—35 циклов амплификации. Каждый цикл включает: денатурацию, 95 °С, 1 мин; отжиг, 55 °С, 30 с; элонгацию, 72 °С, 1 мин. В последнем цикле этап элонгации следует продлить дополнительно на 5 мин. Параллельно каждой ПЦР-реакции с участием исследуемой ДНК необходимо проводить аналогичные реакции с положительным и отрицательным контролями, чтобы убедиться в отсутствии ингибиторов реакции или примесей посторонней ДНК.
8. Если ПЦР-продукты нельзя проанализировать сразу же после окончания реакции, то препараты следует держать в циклере при 15 °С до начала анализа или хранить при 4 °С.

¹⁾ Для лизиса клеток разных микроорганизмов могут потребоваться разные условия, и иногда для этого приходится добавлять лизоцим (см. гл. 13). Если после проведения ПЦР с участием самих лизатов никаких ПЦР-продуктов не обнаруживается, то нужно выделить нуклеиновые кислоты смесью этанол/хлороформ и осадить их этанолом (гл. 12).

²⁾ Концентрацию ионов магния, праймеров, ДНК-полимеразы *Taq* и дезокситрифосфатов для каждой системы нужно подбирать индивидуально (гл. 15), но в большинстве случаев вполне пригодны указанные значения. Было показано, что эти условия обеспечивают амплификацию нуклеиновой кислоты-мишени в позитивных клинических образцах.

ПЦР-продукты можно анализировать несколькими способами. Их можно зафиксировать на твердой подложке (фильтре) и гибридизовать с мечеными зондами или провести гибридизацию в растворе, а затем гель-электрофорез и радиоавтографию. Амплифицированную нуклеиновую кислоту-мишень часто удается обнаружить непосредственно в агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Однако применение ДНК-зондов обеспечивает большую специфичность и чувствительность. В протоколе 19.4 описан быстрый метод анализа ПЦР-продуктов с помощью дот-блот-гибридизации с ³²P-зондами. При этом предполагается использование специального прибора для изготовления дот-блотов, однако образцы можно наносить на фильтры и вручную (гл. 14).

Протокол 19.4. Анализ ПЦР-продуктов с помощью дот-блот-гибридизации с ^{32}P -зондами

Материалы

- Раствор для денатурации: 0,4 М NaOH, 25 мМ свежеприготовленный ЭДТА
- 20 × SSPE: 3,6 М NaCl, 0,2 М фосфат натрия, 0,11 М NaOH, 0,02 М ЭДТА, pH 7,4
- Гибридационный буфер: 2 × SSPE, 0,5% (о/о) ДСН, 5 × раствор Денхардта
- 50 × раствор Денхардта: 1% (в/о) фикоилл, 1% (в/о) поливинилпирролидон, 1% (в/о) БСА
- Раствор для промывания блотов: 2 × SSPE, 0,1% (о/о) ДСН

Методика

1. Вымачивают нейлоновые фильтры с диаметром пор 0,45 мкм (BioDyne B, New York, USA) в дистиллированной воде в течение 20–30 мин. Маркируют фильтр, сделав надрез на одном из углов, и помещают его в аппарат для дот-блот-гибридизации (например, Bio-dot, Bio-Rad, California, USA). Убеждаются в отсутствии на фильтре пузырьков воздуха.
2. Нумеруют нужное количество пробирок для проведения ПЦР, в том числе пробирку для контроля¹⁾. В каждую из них наливают 95 мкл свежеприготовленного раствора для денатурации.
3. Добавляют по 5 мкл раствора с ПЦР-продуктом, перемешивают и инкубируют 10 мин при комнатной температуре, чтобы произошла денатурация продуктов амплификации.
4. Вносят в каждую ячейку аппарата для дот-блот-гибридизации 100 мкл раствора для денатурации и аккуратно фильтруют его через фильтры под вакуумом, не допуская полного высыхания ячеек.
5. В соответствующие ячейки вносят по 100 мкл раствора с денатурированным ПЦР-продуктом, не допуская образования в ячейках воздушных пузырьков.
6. Подсоединяют аппарат к вакууму и отсасывают раствор. Удаляют все пузырьки чистой пипеткой, чтобы раствор беспрепятственно проходил через фильтры. Отключают вакуум.
7. В каждую ячейку добавляют 200 мкл 20 × SSC. Фильтруют этот раствор через мембраны под вакуумом.
8. Отключают вакуумный насос и открывают аппарат. Цветным карандашом помечают фильтры с нанесенными на них образцами. Пинцетом с тупыми концами переносят фильтры на лист фильтровальной бумаги ватман 3 ММ, пропитанной 2 × SSPE.

9. «Пришивают» ДНК к фильтру с помощью УФ-лампы (например, Stratalinker, Stratagene, Inc.)¹⁾.
10. Промывают фильтры в $2 \times \text{SSPE}$ и, если не предполагается сразу же проводить гибридизацию, запаивают их в пластиковых мешочках с 20 мл $2 \times \text{SSPE}$.
11. Прогревают гибридизационный буфер и раствор для промывания блотов в водяной бане при 65°C .
12. Помещают фильтр в пластиковый мешочек, содержащий 20 мл прогретого буфера, и запаивают мешочек. В один мешочек можно поместить сразу два фильтра, сложив их тыльными сторонами.
13. Инкубируют мешочки с фильтрами в водяной бане при 65°C не менее 30 мин. При таком прогревании блокируются места неспецифического связывания зонда.
14. Срезают один из углов мешочка и сливают раствор. Добавляют столько же свежеприготовленного прогретого гибридизационного буфера, содержащего ^{32}P -зонд в концентрации 1 пмоль/мл ($5,0 \cdot 10^5 - 1,0 \cdot 10^6$ имп./мин на 1 пмоль) (гл. 13). По возможности удаляют из мешочка все воздушные пузырьки, запаивают его и инкубируют при 60°C 2 ч. Методы получения ^{32}P -зондов с помощью полинуклеотидкиназы фага T4 описаны в гл. 13 (см. также статьи [3, 12]).
15. Вынимают фильтр из мешочка и аккуратно промокают его. Быстро споласкивают его в растворе для промывания блотов при комнатной температуре, а затем промывают при 60°C в прогревом при 15°C растворе.
16. Помещают фильтр на лист фильтровальной бумаги ватман 3 ММ и высушивают при комнатной температуре или при 37°C в течение 1 ч.
17. Заворачивают фильтр в тонкую пленку и экспонируют при -70°C в кассете с рентгеновской пленкой с усиливающим экраном (гл. 14). Проявляют пленку, как обычно. Время экспозиции зависит от удельной радиоактивности зонда и качества гибридизации между зондом и мишенью.

¹⁾ В качестве альтернативы можно использовать микротитровальную плашку с 96 ячейками.

²⁾ Если нет подходящего источника УФ-света или используются нитроцеллюлозные фильтры, то можно запечь мембрану под вакуумом при 80°C в течение 1–2 ч.

Литература

1. *Kingsberry D. T., Falkow S.* (1987). In: Rapid detection and identification of infectious agents. Academic Press, Orlando, Florida.
2. *Tenover F. C.* (1988). Clin Microbiol. Rev., 1, 82.
3. *Hames B. D., Higgins S. J.* (ed). (1985). Nucleic acid hybridization: a practical approach. IRL Press, Oxford.
4. *Grunstein M., Hogness D.* (1975). Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72, 3961.
5. *Hawhey P. M., Lewis D. A.* (ed). (1989). Medical bacteriology: a practical approach. IRL Press, Oxford.
6. *Jablonski E., Moomaw E. W., Tullis R. H., Ruth J. L.* (1986). Nucleic Acids Res., 14, 6115.
7. *Saiki R. F., Gelfand D. H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A.* (1988). Science, 239, 487.
8. *Frankel G., Giron J. A., Valmassoi J., Schoolnik G. K.* (1989). Mol. Micro., 3, 1729.
9. *Claas H. C. H., Wagenvoort J. H. T., Niesters H. G. M., Tio T. T., Van Rijsoort-Vos J. H., Quint W. G. V.* (1991). J. Clin. Micro., 29, 42.
10. *Jensen J. S., Uldum S. A., Sondergard-Andersen J., Vuust J., Lind K.* (1991). J. Clin. Micro., 29, 46.
11. *Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J.* (ed). (1990). PCR protocols, a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, California.
12. *Maniatis T., Fritsch E. F., Sambrook J.* (ed). (1982). Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY. Перевод: Маниатис Т., Фрич Э., Сэмбрук Дж. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование. Мир, 1984.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ ЛИЧНОСТИ: АНАЛИЗ ПОЛИМОРФИЗМА ДЛИНЫ АМПЛИФИЦИРОВАННЫХ ФРАГМЕНТОВ

Марсиа Эйзенберг, Джозеф А. Чимера

1. Введение

За последние несколько лет для установления отцовства и проведения судебно-медицинских экспертиз все чаще стали применять методы, основанные на выявлении индивидуальных генетических отличий. Такие отличия можно обнаружить, исследуя высокополиморфные участки молекул нуклеиновых кислот, например участки с варьирующим числом коротких повторов (variable number of tandem repeats, VNTR). Анализ аллельных вариантов нескольких полиморфных VNTR-локусов позволяет проследить родственные связи индивидуума или установить причастность того или иного лица к преступлению.

Ранее для выявления и характеристики VNTR-локусов применяли метод полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ). Чтобы провести такой анализ, необходимо выделить из образца ДНК, очистить ее, обработать рестриктирующими эндонуклеазами, осуществить гель-электрофорез, перенести ДНК с геля на нейлоновый фильтр, провести блот-гибридизацию ДНК с радиоактивно меченным зондом, содержащим нужную VNTR-последовательность, и радиавтографию. В результате на идентификацию личности с помощью ПДРФ уходит от 5 до 10 дней.

Недавно для выявления VNTR-локусов был предложен другой метод, основанный на применении полимеразной цепной реакции [1]. Как и в случае ПДРФ (гл. 21), для проведения ПЦР прежде всего выделяют ДНК. Но затем вместо рестрикции ДНК проводят ее ПЦР-амплификацию, чтобы получить миллионы копий локуса ДНК, содержащего VNTR-последовательность (рис. 20.1). ПЦР-продукты можно быстро проанализировать с помощью гель-электрофореза в полиакриламидном геле и окрашивания солями серебра. Такой способ исследования VNTR-локусов получил название метода полиморфизма длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ); в данной главе мы рассмотрим его применение для изучения полиморфизма локуса D1S80 с целью установления отцовства [2, 3].

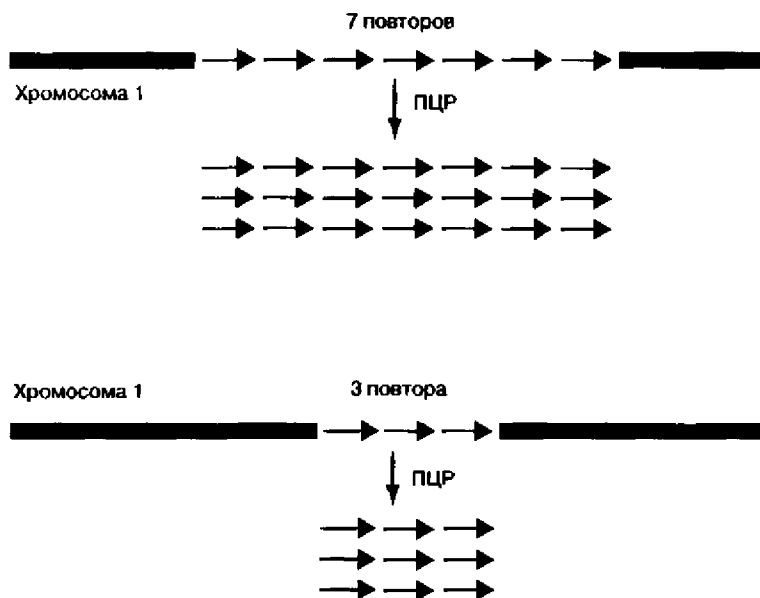


Рис. 20.1. Применение метода ПЦР-ПДАФ для анализа локуса D1S80 хромосомы 1. Стрелки — tandemно повторяющиеся короткие последовательности, присутствующие в разных аллелях в разном числе (3 и 7).

Для проведения ПДАФ-анализа необходимо следующее оборудование.

- Ротатор для лабораторных пробирок (Fisher Sci # 13688-ID).
- Микроцентрифуга.
- Боксы для подготовки образцов и проведения амплификации (например, бокс для культур тканей Labconco, Fisher Sci # 16-105; см. также гл. 15).
- Термостаты.
- Нагревательная ячейка.
- Центрифужные пробирки на 2 мл с закручивающимися крышками.
- Пробирки для амплификации Perkin—Elmer Cetus Gene Amplification Tubes или пробирки с закручивающимися крышками на 0,5 мл Contitental Products (# 3435).
- Поршневые микропипетки с соответствующими наконечниками и микродозаторы типа Rainin с наконечниками с ART-фильтрами Contitental Products (# 2069 для наконечников P200, # 2149 для наконечников P20).

- Термоциклер (например, модель 480 фирмы Perkin—Elmer).
- Прибор для вертикального электрофореза в полиакриламидном геле (Hoefer, SE 410-24 см).
- Источник питания для этого прибора, дающий постоянное напряжение до 250 В (например, Hoefer PS250).
- Качалка (New Brunswick Sci. Co, Gyrtator shaker, модель G-2; можно приобрести в фирме Fisher Scientific).

2. Выделение ДНК

Для выделения ДНК из цельной крови или из засохших пятен крови используют различные методы. Любой из них включает лизис клеток с высвобождением ядерной ДНК и очистку ДНК от используемых для амплификации ДНК-полимераз. Очень важно исключить попадание в препараты нуклеаз и ДНК от экспериментатора, а также продуктов предшествующих ПЦР-амплификаций или других препаратов ДНК; их источниками могут быть загрязненные реактивы и оборудование (особенно автоматические микропипетки). В связи с этим всю работу по выделению ДНК необходимо проводить в перчатках и — там, где это возможно, — использовать автоклавированные растворы и лабораторную посуду. Лучше всего физически разделить процессы выделения ДНК и анализа ПЦР-продуктов и использовать только специально предназначенное для этого оборудование (более подробно эти вопросы рассмотрены в гл. 15).

Протокол 20.1. Быстрое выделение ДНК из цельной крови или засохших пятен крови с использованием смолы Chelex

1. В центрифужную пробирку на 2 мл вносят 1 мл стерильной дистиллированной воды и добавляют 5 мкл крови или 3 мм² материала с засохшей кровью. Тщательно перемешивают.
2. Инкубируют при тщательном перемешивании 20 мин при комнатной температуре (лучше всего использовать ротатор для центрифужных пробирок).
3. Центрифугируют при 10 000 g 3 мин и удаляют супернатант, оставляя (чтобы не взмутить осадок клеток или ткань) 20–30 мкл.
4. Добавляют 5% раствор Chelex до конечного объема 200 мкл (Chelex в натриевой форме, 100–200 меш, Bio-Rad, 5% раствор в стерильной дистиллированной воде). Перед добавлением смолу перемешивают до гомогенного состояния пипеткой с широким отверстием (например, наконечником от микропипетки P1000).

Протокол 20.1 (Продолжение)

5. Инкубируют при 56 °С 30 мин и встряхивают в течение 10 с.
6. Кипятят образец 8 мин, встряхивают в течение 10 с и центрифугируют при 10 000 g 3 мин.
7. Для каждой ПЦР берут из полученного супернатанта 20 мкл.

3. Амплификация локуса D1S80

ПЦР — это метод синтеза нуклеиновых кислот *in vitro*, в ходе которого происходит многократная репликация определенного участка ДНК (см. гл. 15). Специфичность ПЦР определяется подбором олигонуклеотидных праймеров, фланкирующих выбранный для амплификации VNTR-локус. Эти праймеры гибридизуются с разными цепями ДНК в окрестности VNTR и ориентированы друг относительно друга таким образом, что амплифицируется участок ДНК, расположенный между ними. В протоколе 20.2 описан метод амплификации локуса D1S80.

При установлении отцовства образцы крови матери, ребенка и предполагаемого отца подготавливают так, как это описано в протоколе 20.1, и полученную ДНК вносят в пробирки с реакционной смесью для ПЦР (см. табл. 20.1). Все пробирки помещают в термоциклер. Описанные в протоколе 20.2 состав реакционной смеси для проведения ПЦР и условия амплификации оптимизированы для термоциклера модели 480 фирмы Perkin—Elmer, и если применяются другие модели, их, возможно, придется модифицировать. Вначале реакционную смесь нагревают до примерно 95 °С, чтобы денатурировать двухцепочечные молекулы ДНК; затем температуру понижают до уровня, при котором происходит отжиг

Таблица 20.1. Состав реакционной смеси для амплификации локуса D1S80

2 × реакционная смесь

- 2 × буфер для полимеразы *Taq*: 20 мМ трис-НCl, 100 мМ KCl, 3 мМ MgCl₂, 0,02% желатина, pH 8,4
- по 1,6 мМ растворенных в стерильной дистиллированной воде dATP, dCTP, dGTP, dTTP
- по 50 пмоль почищенных с помощью ЖХВР праймеров

МСТ 118-1 5' GGGAAACTGGCCTCCAAACACTGCCCCGCCG 3'

МСТ 118-2 5' GGGTCTTGTTGGAGATGCACGTGCCCCCTTGC 3'

- 5 ЕД рекомбинантной полимеразы *Taq* на 50 мкл 2 × реакционной смеси (добавляют в смесь непосредственно перед ее использованием)

праймера на фланкирующих VNTR-локус последовательностях. На последнем этапе цикла температуру повышают до 72 °С; в этих условиях полимеразы *Taq* присоединяет нуклеотиды к 3'-концам праймеров, и в результате образуется последовательность, идентичная VNTR. За каждый цикл ПЦР, состоящий из этапов денатурации, отжига праймера и элонгации, происходит удвоение числа последовательности-мишени, образовавшейся в предыдущем цикле, так что амплифицированные фрагменты ДНК матери, ребенка и предполагаемого отца не составляет труда выявить с помощью гель-электрофореза и окрашивания серебром.

Для выделения ДНК и проведения ПЦР необходимо использовать разные комплекты перчаток и лабораторной одежды. Сами эти процедуры должны проводиться в отдельных закрытых боксах, а анализ продуктов амплификации — в специальном помещении. На всех этапах необходимо использовать поршневые микропипетки с соответствующими наконечниками или наконечники с фильтрами фирмы Continental Products.

Протокол 20.2. Амплификация локуса D1S80

Материалы

- Реакционная смесь (см. табл. 20.1)
- Полимеразы *Taq* (Perkin—Elmer Cetus # 8010046)
- 5 × буфер для нанесения с сахарозой: 60% (в/о) сахароза, 0,25% ксилолцианол, 0,25% бромфеноловый синий

Методика

- За 30 мин до начала работы включают термоциклер
 - За 10 мин до начала работы нагревают термоциклер до 95 °С
1. В пробирки для амплификации вносят по 30 мкл стерильной дистиллированной воды. Параллельно каждой реакции ставят опыты с отрицательным контролем (вода) и положительным (известная ДНК) (см. также гл. 15).
 2. В пробирки для амплификации вносят по 20 мкл ДНК, выделенной, как описано в протоколе 20.1, или по 300 нг очищенной ДНК, растворенной в 20 мкл. В пробирку с отрицательным контролем добавляют 20 мкл стерильной дистиллированной воды.
 3. Размораживают 2 × реакционную смесь для амплификации (табл. 20.1), добавляют по 5 ЕД полимеразы *Taq* на каждые 50 мкл смеси и тщательно перемешивают.

Протокол 20.2 (Продолжение)

4. К каждому образцу ДНК, а также к положительному и отрицательному контролю добавляют 50 мкл 2 × реакционной смеси.
 5. Центрифугируют каждую пробирку при 12 000 g на микроцентрифуге 5 с и помещают пробирки в термоциклер.
 6. Прогревают образцы при 95 °С 5 мин и проводят 25 циклов амплификации. Каждый цикл состоит из отжига праймера (65 °С, 1 мин), элонгации (72 °С, 1 мин) и денатурации (95 °С, 1 мин). По окончании последнего цикла пробирки медленно охлаждают до 50 °С со скоростью 1 °С в секунду, после чего быстро охлаждают до 4 °С и оставляют при этой температуре.
 7. Центрифугируют пробирки при 12 000 g 5 с на микроцентрифуге и хранят ПЦР-продукты при -20 °С.
 8. Из каждой пробирки отбирают 20 мкл и вносят их в пробирку с 5 мкл 5 × буфера для нанесения.
 9. При анализе смеси амплифицированных ДНК ребенка и предполагаемого отца добавляют в пробирки с 5 мкл 5 × буфера для нанесения по 10 мкл соответствующих ДНК.
-

4. Анализ ПЦР-продуктов

Поскольку в результате ПЦР образуется большое количество ДНК, анализ ПДАФ можно проводить непосредственно, без гибридизации по Саузерну с радиоактивно меченным зондом. При этом интерпретация результатов не составляет труда, не занимает много времени и легко поддается стандартизации, поскольку не нужно, как в случае ПДРФ, точно определять длину фрагментов ДНК. Вместо этого параллельно с исследуемым образцом анализируют смесь всех возможных аллельных вариантов данного локуса. Генетический профиль индивидуума определяют, проводя сравнение со стандартной смесью аллельных вариантов.

При амплификации локуса D1S80 размер амплифицированных фрагментов варьирует от 375 до 850 п.н. при длине повтора только 16 п.н. Для хорошего разделения аллелей, различающихся только на один повтор, мы используем 6% полиакриламидный гель толщиной 0,75 мм и длиной 24 см (состав смеси для получения геля приведен в табл. 20.2). Гель формируют на пленке Gel Bond, облегчающей манипуляции с ним во время окрашивания (см. рекомендации фирмы-производителя FMC). Полимеризация

Таблица 20.2. Состав смеси для получения 6% полиакриламидного геля (размер 14 см × 24 см × 0,75 мм)

• 30% акриламид (29,1 г полиакриламида; 0,9 г бис-акриламида)	7,5 мл
• 20% глицерин	13,12 мл
• 10% персульфат аммония	0,375 мл
• 10 × буфер ТБЭ: 0,45 М трис-НСl, 0,025 М Na-ЭДТА, 0,9 М борная кислота, pH 9,0	3,75 мл
• Дистиллированная вода	12,7 мл
• TEMED	0,0375 мл
Общий объем	37,5 мл

должна идти не менее 1—1,5 ч. Затем из геля вынимают гребенку и трижды промывают лунки 1 × ТВЭ (табл. 20.2). Вносят в лунки по 15—20 мкл ПЦР-амплифицированной ДНК и аккуратно заполняют их доверху 1 × ТВЭ. По обе стороны от набора образцов амплифицированной ДНК наносят растворенный в 1 × буфере для полимеразы *Taq* маркер с аллелями разного размера (см. табл. 20.1), например в следующем порядке:

Дорожки	1	2	3	4	5	6
	Маркер- ная смесь аллельных вариантов	Мать	Ребенок	Предполага- емый отец	Смесь ДНК ребенка и предполага- емого отца	Маркер- ная смесь аллельных вариантов

Обычно утром готовят образцы ДНК, днем проводят амплификацию, на ночь ставят электрофорез при постоянном напряжении 110 В, а на следующий день проводят окрашивание серебром, как это описано в протоколе 20.3.

Протокол 20.3. Окрашивание полиакриламидных гелей серебром

Материалы

- 1% (о/о) азотная кислота
- 0,012 М нитрат серебра
- 37% формальдегид (см. гл. 12)
- 37% (о/о) уксусная кислота
- Проявитель: 0,28 М углекислый натрий

Протокол 20.3 (Продолжение)

Методика

1. Разбирают камеру для электрофореза и фиксированный на Gel Bond гель помещают (пленкой вниз) на стекло. Для окрашивания берут по 350 мл каждого раствора и выполняют все операции в шейкере при интенсивном покачивании. Если гель был залит без использования пленки Gel Bond, то его при окрашивании нельзя сильно встряхивать.
2. Заливают гель на 10 мин 10% спиртом, затем спирт сливают.
3. Заливают гель 1% азотной кислотой на 6 мин, затем кислоту сливают.
4. Ополаскивают гель дистиллированной водой, затем промывают его в воде при интенсивном встряхивании в течение 5 мин.
5. На 40 мин заливают гель раствором нитрата серебра, затем раствор сливают.
6. Дважды при интенсивном встряхивании промывают гель водой.
7. К 350 мл охлажденного до 4 °C проявителя добавляют 175 мкл формальдегида. Таким охлажденным раствором заливают гель и покачивают его до тех пор, пока не будут отчетливо видны окрашенные фрагменты. Затем проявитель сливают.
8. Чтобы остановить проявление, гель помещают на 5 мин в 10% уксусную кислоту, затем кислоту сливают.
9. Промывают гель в дистиллированной воде в течение как минимум 5 мин.
10. После окрашивания гель можно сушить на воздухе (если он был залит на пленке Gel Bond) или с помощью вакуумной сушилки для гелей на фильтровальной бумаге ватман или пористом целлофане (фирмы Hoefer Scientific).

5. Интерпретация результатов

Каждый аллель в анализируемых образцах ДНК можно точно идентифицировать, сравнив положение на окрашенной серебром электрофореграмме амплифицированных фрагментов ДНК матери, ребенка и предполагаемого отца с положением фрагментов маркерной смеси аллелей. Например, из рис. 20.2 для случая подтвержденного отцовства видно, что у матери присутствуют аллели 6 и 9. У ребенка выявлены те же аллели, тогда как у предполагаемого отца — аллели 3 и 9. Поскольку ребенок мог унаследовать аллели 6 и 9 от своей матери, у биологического отца один из этих



Рис. 20.2. Установление отцовства с помощью метода ПЦР-ПДАФ. Положение полос с продуктами амплификации локуса D1S80 в окрашенном сереброем полиакриламидном геле даны для двух случаев: подтвержденного отцовства и исключенного. М — мать, Р — ребенок, ПО — предполагаемый отец, MC — маркерная смесь аллелей, РПО — ребенок + предполагаемый отец.

аллелей должен отсутствовать. У предполагаемого отца аллель 9 действительно отсутствует и, следовательно, он может быть отцом ребенка. При этом вероятность того, что предполагаемый отец является биологическим отцом, определяется частотой встречаемости аллеля 9 в его этнической группе (см. табл. 20.3).

Для случая неподтвержденного отцовства мать гомозиготна по аллелю 11, у ребенка найдены аллели 11 и 3, у предполагаемого отца — аллели 3 и 11. Аллель 11 ребенок получил от своей матери и, следовательно, от биологического отца он должен был получить аллель 3. Но у предполагаемого отца этот аллель отсутствует, и, следовательно, отцовство должно быть исключено.

Вероятность правильного установления отцовства или идентификации личности зависит от того, насколько точно определены частоты аллелей или генотипов. В табл. 20.3 приведены данные по частоте аллельных вариантов локуса D1S80, полученные при анализе проб крови у лиц, случайно отобранных в более чем 500 населенных пунктах на территории США, и основанные на изучении более чем 400 аллелей в следующих этнических группах: афроамериканцы, латиноамериканцы, белые американцы. Вероятность правильного исключения отцовства или идентификации личности при анализе локуса D1S80 составляет при этом 0,6028 для белых американцев, 0,7837 для афроамериканцев, 0,7250 для латиноамериканцев.

Таблица 20.3. Частоты аллелей локуса D1S80

Аллель	Белые американцы	Афроамериканцы	Латиноамериканцы
1	0,007	0,0002	0,01
2	0	0,041	0,007
3	0,209	0,068	0,296
4	0,004	0	0,007
5	0,022	0,023	0,022
6	0,029	0,166	0,035
7	0,02	0,072	0,054
8	0,009	0,035	0,012
9	0,321	0,188	0,296
10	0,042	0,052	0,077
11	0,016	0,014	0,03
12	0,007	0,004	0,027
13	0,038	0,135	0,069
14	0,056	0,046	0,067
15	0,02	0,014	0,035
16	0,08	0,056	0,052
17	0,007	0,004	0
18	0,007	0,068	0,01
19	0	0,004	0
20	0,002	0,004	0,002
21	0,002	0	0
22	0,002	0	0
23	0,002	0,002	0

Обычно для получения достаточно достоверных результатов при установлении отцовства с использованием метода ПЦР-ПДАФ анализируют четыре или пять независимо наследуемых локусов [4, 5]. Описанные в этой главе основные принципы метода и конкретные методики можно использовать и для идентификации личности при проведении судебно-медицинских экспертиз.

Литература

1. Mullis K., Faloona F. (1987). In: Methods in enzymology, Vol. 155 (ed. R. Wu), pp. 335–50. Academic Press, London.
2. Nakamura Y., Carlson M., Krapcho K., White R. (1988). Nucleic Acids Res., 16, 9364.
3. Budowle B., Chakraborty R., Giusti A. M., Eisenberg A. J., Allen R. C. (1991). Am. J. Hum. Genet., 48, 926.
4. American Association of Blood Banks, Virginia. (1983). Inclusion probabilities in parentage testing (ed. R. Walker).
5. Kirby L. T. (1990). In: DNA fingerprinting, pp. 149–78. Stockton Press, New York.

АНАЛИЗ ДНК В АРХИВНЫХ ОБРАЗЦАХ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ПАТОГЕНЕЗА ОПУХОЛЕЙ

В. Ясуи, Х. Ито, Е. Тахара

1. Введение

Последние успехи молекулярной биологии позволяют по-новому взглянуть на патогенез многих заболеваний. Например, показано, что развитию опухолей предшествуют генетические нарушения, приводящие к изменению структуры онкогенов и генов — супрессоров опухолей (анти-онкогенов) [1–3]. Это открытие было сделано в значительной мере благодаря созданию новых методов быстрого выявления генетических нарушений в биоптатах опухолевых тканей.

В этой главе описано применение молекулярных методов для исследования опухолей, причем особое внимание уделено тем методам, которые пригодны для работы с обычным архивным материалом. Прежде всего мы остановимся на выявлении точковых мутаций в свежеполученных архивных образцах. Далее рассмотрим методы выявления амплификации генов, а затем — потери гетерозиготности (ПГ) с помощью анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (ПДРФ).

2. Выявление точковых мутаций

Для выявления точковых мутаций можно использовать как минимум три метода. Первый из них — метод аллель-специфичной гибридизации; в его основе лежит тот факт, что дуплекс, образующийся при отжиге олигонуклеотида с исследуемым генным локусом, становится крайне нестабильным при наличии всего одного неспаренного нуклеотида [4]. Метод состоит из двух этапов:

- а) амплификация ДНК с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР);
- б) скрининг амплифицированной ДНК, фиксированной на фильтрах, путем ее гибридизации с изотопно меченными синтетическими олигомерами, которые соответствуют полипептидам с возможными аминокислотными заменами.

Второй метод — это прямое секвенирование ДНК, амплифицированной с помощью ПЦР (см. гл. 16). Простой и чувствительный третий метод был разработан сравнительно недавно [5] и получил название анализа одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP). Этот метод основан на одновременной амплификации и мечении определенных участков геномной ДНК при проведении ПЦР с мечеными dNTP и на том, что скорость движения одноцепочечных фрагментов в полиакриламидных гелях в неденатурирующих условиях зависит не только от их размера, но и от нуклеотидной последовательности.

2.1. Аллель-специфичная гибридизация

До гибридизации необходимо выделить ДНК из клинических образцов и провести ее ПЦР-амплификацию [6].

2.1.1. Выделение ДНК

ДНК можно выделять из фиксированных в формалине, залитых в парафин тканей, подготовленных для обычных гистологических исследований (протокол 21.1) [7, 8]. Под действием формальдегида в ДНК образуются шиффовы основания, а между ДНК и белками — сшивки [9]. В водных растворах оба этих процесса обратимы, поэтому ДНК можно выделить из фиксированных формалином тканей. Такая ДНК не является в полной мере интактной, но она находится в двухцепочечной форме, ее можно рестрицировать, гибридизовать с мечеными зондами и амплифицировать с помощью ПЦР. Однако лучше все-таки выделять ДНК из свежих или замороженных тканей, поскольку получаемые при этом препараты более пригодны для большинства стандартных молекулярно-генетических методов [10]. Методы выделения ДНК из нефиксированных тканей описаны в гл. 12.

Протокол 21.1. Выделение ДНК из фиксированных формалином и залитых в парафин препаратов тканей

Материалы

- 10 × SSC: 1,5 М NaCl, 0,15 М цитрат натрия; pH доводят до 7,0 с помощью 1 М HCl
- Протеиназа К: 10 мг/мл в стерильной дистиллированной воде
- Смесь фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (25:24:1)
- 3 М ацетат натрия, pH 5,2

- Охлажденный спирт
- Буфер ТЭ: 10 мМ трис-НСl, рН 8,0, 1 мМ ЭДТА

Методика

1. С помощью микротомы получают 5–10 срезов толщиной 20 мкм¹⁾.
2. Срезы депарафинируют так же, как при изготовлении обычных гистологических препаратов. Для этого их инкубируют по 10 мин в трех сменах ксилола, 100% этанола, 70% этанола и воды, а затем ополаскивают 1 × SSC.
3. С помощью стерильного скальпеля или бритвы вырезают нужный кусочек.
4. Помещают его в 3 мл раствора, полученного смешиванием 2470 мкл 1 × SSC, 500 мкл 10% ДСН и 30 мкл протеиназы К (10 мг/мл), и инкубируют при 37 °С в течение 5–10 сут. Каждые 2–3 сут добавляют новые аликваты протеиназы К.
5. Экстрагируют белки смесью фенол : хлороформ : изоамиловый спирт (25:24:1) (см. гл. 12).
6. Осаждают ДНК охлажденным спиртом и полученный осадок растворяют в 200 мкл ТЭ (см. гл. 12).

¹⁾ Нельзя выделять ДНК из блоков с признаками некроза или аутолиза: неудачи с получением более или менее интактной ДНК чаще всего связаны с неправильной фиксацией тканей.

2.1.2. Амплификация ДНК с помощью ПЦР

Основные принципы ПЦР были подробно рассмотрены в гл. 15, и далее мы остановимся на методе амплификации ДНК из опухолевых клеток, предшествующей аллель-специфичной гибридизации. К сожалению, абсолютно надежного способа подбора высокоэффективных праймеров для амплификации не существует, но все же полезно учитывать следующее.

- GC-содержание в праймерах должно быть близко к 50%, а распределение нуклеотидов — случайным.
- Необходимо использовать праймеры, не образующие вторичную структуру. Вероятность образования такой структуры можно оценить с помощью компьютерных программ Squiggles или Circles.
- Необходимо проверить взаимную комплементарность праймеров и не использовать те из них, у которых комплементарны 3'-концевые последовательности. Это уменьшит вероятность димеризации праймеров в процессе амплификации.

Протокол 21.2. Амплификация геномной ДНК с помощью ПЦР

Материалы

- 10 × буфер для ПЦР: 500 мМ KCl, 100 мМ трис-HCl, pH 8,3, 15 мМ MgCl₂, 0,1% (в/о) желатина
- 10 × смесь dNTP: по 2 мМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP
- ДНК-полимераза *Taq*: 5000 ЕД/мл (Perkin—Elmer Cetus)
- Геномная ДНК: 250–500 нг
- 10 × праймер 1: 10 мкМ в буфере ТЭ
- 10 × праймер 2: 10 мкМ в буфере ТЭ

Методика

1. В стерильную эппендорфовскую пробирку вносят по 10 мкл 10 × буфера для ПЦР, 10 × смеси dNTP, 10 × праймера 1, 10 × праймера 2, образец ДНК; доводят объем стерильной дистиллированной водой до 100 мкл.
2. Денатурируют ДНК прогреванием при 90–95 °С в течение 10 мин.
3. Добавляют 2,5 ЕД (0,5 мкл) ДНК-полимеразы *Taq*, тщательно перемешивают и наслаивают несколько капель вазелинового масла.
4. Проводят 30–35 циклов амплификации¹⁾ (см. гл. 15).
5. Из реакционной смеси отбирают аликвоту и анализируют результаты амплификации с помощью электрофореза в агарозном геле и окрашивания бромистым этидием (см. гл. 12 и 15).

¹⁾ При амплификации ДНК, полученной из фиксированных формалином и депарафинированных тканей, иногда приходится увеличивать число циклов до 50. Возможно, это связано с апуринизацией ДНК под действием формалина.

2.1.3. Дот-блот-гибридизация

На втором этапе аллель-специфичной гибридизации ДНК иммобилизуют на фильтре и гибридизуют с олигонуклеотидным зондом, охватывающим участок с предполагаемой мутацией (протокол 21.3). Обычно используют зонды с радиоактивно мечеными концами (см. гл. 13) [11, 12].

Протокол 21.3. Дот-блот-гибридизация

А. Иммобилизация ДНК на нитроцеллюлозном фильтре

Материалы

- Образцы ДНК
- 1 М NaOH

- Буфер ТЭ (см. протокол 21.1)
- 2 М ацетат аммония
- Нитроцеллюлозные фильтры (BA85, Schleicher & Schuell)
- Прибор для дот-блот-гибридизации (например, Manifold-II, Schleicher & Schuell; Bio-Dot SF, Bio-Rad)

Методика

1. 10 мкг ДНК растворяют в 50 мкл 0,4 М NaOH, приготовленной на ТЭ-буфере.
2. Инкубируют раствор при 37 °С 10 мин и нейтрализуют его равным объемом 2 М ацетата аммония.
3. Вручную или с помощью прибора для дот-блот-гибридизации наносят ДНК на нитроцеллюлозный фильтр (см. гл. 14).
4. Прожаривают фильтр при 80 °С под вакуумом в течение 2 ч.

Б. Гибридизация

Материалы

- 20 × SSPE: 3 М NaCl, 200 мМ NaH_2PO_4 , 50 мМ ЭДТА, pH 7,4
- 100 × раствор Денхардта: 2% (в/о) фикоилл, 2% (в/о) поливинилпирролидон, 2% (в/о) БСА (фракция 5). Раствор готовят на стерильной дистиллированной воде
- 10 × SSC (см. протокол 21.1)
- Буфер для отмывания: 3 М тетраметиламмонийхлорид, 50 мМ трис-HCl, pH 8,0, мМ ЭДТА, 0,1% ДСН
- 10% ДСН
- ^{32}P -зонд¹⁾

Методика

1. Проводят предгибридизацию при 65 °С в течение 2 ч в буфере следующего состава: 5 × SSPE, 5 × раствор Денхардта, 5% ДСН.
2. Добавляют ^{32}P -зонд (1–1,5 мкМ).
3. Проводят гибридизацию при 65 °С в течение 6 ч (или в течение ночи).
4. При непрерывном покачивании отмывают фильтр в следующих растворах:
 - а) 5 × SSC: две смены по 15 мин при комнатной температуре;
 - б) буфер для отмывания: 20 мин при 61 °С;
 - в) 5 × SSC: 10 мин при комнатной температуре.
5. Высушивают фильтр на воздухе и проводят радиоавтографию (см. гл. 14).

¹⁾ Получение зондов с мечеными концами описано в гл. 13 и в работах [10, 14].

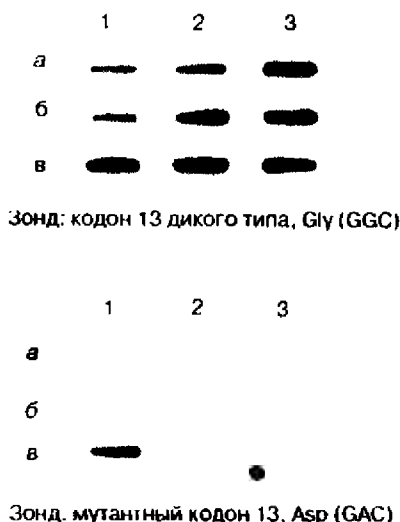


Рис. 21.1. Выявление точковых мутаций в гене *Ki-ras* при карциноме желудка у человека с помощью аллель-специфичной гибридизации в сочетании с ПЦР. На фильтр было нанесено 10 мкг ДНК, амплифицированной *in vitro* с помощью праймеров 5'-TTTTATTATAAGGCCTGCT-3' и 5'-GTCCASAAAATGATTCTGAA-3' [13]. Для гибридизации использовали ^{32}P -зонды, специфичные по отношению к гену *Ki-ras* дикого типа и к этому же гену, несущему мутацию Asp-13.

В качестве примера на рис. 21.1 приведены результаты дот-блот-гибридизации, полученные в соответствии с изложенным выше. Эффективность гибридизации и стабильность гибридов зависят как от искомой последовательности, так и от размера зонда (олигонуклеотида); оптимальные условия отмывания для каждого зонда подбирают опытным путем. В каждом эксперименте в число образцов включают мутантную и немутантную ДНК и проводят гибридизацию с зондами, комплементарными как последовательности дикого типа, так и последовательности, несущей мутацию.

2.2. Прямое секвенирование ПЦР-амплифицированной ДНК

Для выявления мутаций можно также использовать прямое секвенирование ДНК, амплифицированной *in vitro* с помощью ПЦР [4, 14]. Такое секвенирование описано в гл. 16.

2.3. Анализ SSCP

В этом случае анализируемую последовательность амплифицируют и одновременно метят с помощью ПЦР, используя меченые праймеры или нуклеотиды (протокол 21.4) [5]. Если длина амплифицированного фрагмента не превышает 200 нуклеотидов, то большинство точковых мутаций (например, мутаций в гене *ras*) можно выявить по изменению скорости движения фрагмента при гель-электрофорезе с помощью анализа SSCP [15, 16]. И хотя этот метод не позволяет точно определить ни локализацию, ни характер мутации, он достаточно прост, не занимает много времени и обладает высокой эффективностью, что делает его очень полезным при скрининге точковых мутаций. Если мутация выявлена, то для определения ее характера и локализации можно использовать другие методы, например прямое секвенирование.

Протокол 21.4. Анализ одноцепочечного конформационного полиморфизма (SSCP)

Материалы

- Образец ДНК: 50 нг/мкл
- 10 × полинуклеотидкиназный буфер: 500 мМ трис-НСl, pH 8,3, 100 мМ MgCl₂, 50 мМ ДТТ
- Полинуклеотидкиназа (ПК): 10 ЕД/мкл
- γ -³²P-АТР: 160 мКи/мл, 700 Ки/ммоль
- 10 × буфер для ПЦР: 200 мМ трис-НСl, pH 8,3, 500 мМ KCl, 20 мМ MgCl₂, 1 мг/мл БСА
- Смесь dNTP: по 1,25 мМ dATP, dGTP, dCTP, dTTP
- ДНК-полимераза *Taq*: 5000 ЕД/мл (фирмы Perkin—Elmer Cetus)
- Праймеры в концентрации 10 мкМ каждый
- Краситель с формамидом: 95% формамид, 10 мМ ЭДТА, 0,05% бромфеноловый синий, 0,05% ксилолцианол
- Раствор акриламида: 49% акриламид, 1% N,N'-метиленис-акриламид
- 10 × ТВЭ: 0,5 М основной трис, 0,5 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА
- Термоциклер (например, Cetus или Pharmacia GeneA-TAQ)
- Прибор для гель-электрофореза

Методика

1. Готовят смесь следующего состава и инкубируют ее 30 мин:

Протокол 21.4 (Продолжение)

- Вода 1 мкл
 - Праймеры по 1 мкл каждого
 - 10 × ПК-буфер 0,5 мкл
 - γ - ^{32}P -АТР 1 мкл
 - Полинуклеотидкиназа 0,5 мкл
2. Добавляют 255 мкл воды, 40 мкл 10 × буфера для ПЦР и 20 мкл смеси dNTP.
 3. Из полученной смеси отбирают 80 мкл и добавляют 0,5 мкл ДНК-полимеразы *Taq*.
 4. Из этой смеси переносят 4 мкл в пробирку на 0,5 мл, добавляют 1 мкл ДНК, перемешивают и наслаивают несколько капель минерального масла.
 5. Прогревают пробирку при 94 °С 1 мин и проводят 30 циклов амплификации (денатурация: 94 °С, 20 с; отжиг и элонгация: 60 или 65 °С, 2 мин).
 6. Добавляют в пробирку 45 мкл красителя с формамидом и центрифугируют ее при 12 000 g 2 мин.
 7. Собирают прибор для гель-электрофореза и заливают гель следующего состава:
 - 10 × ТБЭ 1,5 мл
 - 50% глицерин 3,0 мл
 - Раствор акриламида 3,0 мл
 - 1,6% персульфат аммония 1,0 мл
 - Вода 21,5 мл
 - TEMED 30 мкл
 8. Прогревают амплифицированную ДНК в красителе с формамидом при 80 °С 5 мин и вносят в лунку 1 мкл образца.
 9. Проводят электрофорез с охлаждением при постоянной мощности 40 Вт до тех пор, пока ксилолцианол не дойдет до уровня, отстоящего от конца геля на 5 см.
 10. Гель высушивают и проводят радиоавтографию (см. гл. 14).

3. Выявление амплификации генов

Амплификацию генов в фиксированных формалином и залитых в парафин тканях можно выявить с помощью дот-блот-гибридизации (см. протокол 21.5). Проводя такую гибридизацию, необходимо быть уверенными в ее специфичности. При работе со

свежими или замороженными тканями наилучшие результаты дает блот-гибридизация по Саузерну (см. гл. 14) [10, 17]. Для выявления амплификации сравнивают с помощью денситометра интенсивности сигналов, получаемых при одновременной гибридизации равных количеств анализируемой ДНК с интересующим исследователя геном и с известным уникальным (например, β -глобиновым) геном или при последовательной гибридизации одного и того же фильтра с двумя этими зондами.

Протокол 21.5. Выявление амплификации генов с помощью дот-блот-гибридизации

Материалы

- Образцы ДНК (из фиксированных формалином и залитых в парафин тканей; см. протокол 21.1)
- ТЭ/NaOH: 0,4 М NaOH в буфере ТЭ (см. протокол 21.1)
- ДНК спермы лосося, обработанная ультразвуком
- 20 × SSPE (см. протокол 21.1)
- 100 × раствор Денхардта (см. протокол 21.3)
- 10 × SSC (см. протокол 21.1)
- Предгибризационный буфер (см. протокол 21.3)
- ^{32}P -зонд, полученный с помощью концевое мечения или метода рассеянной затравки¹⁾
- Нитроцеллюлозный фильтр
- Прибор для дот-блот-гибридизации

Методика

1. Выделяют ДНК из фиксированных формалином и залитых в парафин тканей, как описано в протоколе 21.1.
2. Растворяют 10 мкг ДНК в 50 мкл буфера ТЭ/NaOH.
3. Делают серийные разведения (например, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16) полученного раствора ДНК в буфере ТЭ/NaOH и доводят концентрацию ДНК во всех разведениях до 10 мкг в 50 мкл с помощью разведенной в том же буфере ДНК спермы лосося.
4. Инкубируют при 37 °С 10 мин и добавляют 50 мкл ацетата аммония.
5. Вручную или с помощью прибора для дот-блот-гибридизации наносят ДНК на нитроцеллюлозный фильтр (см. гл. 15) и прожаривают фильтр при 80 °С под вакуумом в течение 2 ч.
6. Проводят предгибридизацию и гибридизацию с ^{32}P -зондом, как описано в протоколе 21.3.

Протокол 21.5 (Продолжение)

7. Отмывают фильтр при непрерывном покачивании в следующих растворах:

- а) $0,1 \times \text{SSC}$, $0,1\%$ ДСН, две смены по 15 мин при комнатной температуре;
- б) $0,1 \times \text{SSC}$, $0,1\%$ ДСН, две смены по 30 мин при температуре 65°C ;
- в) $0,1 \times \text{SSC}$, две смены по 10 мин при комнатной температуре.

8. Высушивают фильтр на воздухе и проводят радиоавтографию.

¹⁾ ^{32}P -мечение зондов описано в гл. 13.

4. Выявление потери гетерозиготности (ПГ) с помощью метода ПДРФ

Принцип метода ПДРФ иллюстрирует рис. 21.2 [18, 19]. Рестриктирующая эндонуклеаза, узнающая специфические последовательности, расщепляет по ним ДНК с образованием фрагментов, длину которых можно определить с помощью электрофореза в агарозном геле. Размер рестрикционных фрагментов у разных лиц может различаться, например, вследствие замены одного или нескольких нуклеотидов, сопровождающейся потерей сайта рестрикции или, напротив, появлением нового сайта. Изменение размера фрагментов может происходить и в результате вставок или делеций протяженных участков ДНК. В обоих случаях изменяется скорость перемещения рестрикционных фрагментов при гель-электрофорезе, и эти фрагменты легко идентифицировать с помощью блот-гибридизации по Саузерну с использованием меченого зонда, узнающего прилежащую к сайту рестрикции или сцепленную с ним последовательность. Метод анализа ПГ применяется при определении группы сцепления наследственных болезней и для выявления делеций определенных генов в опухолевых клетках. При этом можно работать с ДНК, выделенной как из свежих тканей, так и из архивных препаратов.

4.1. Выбор маркеров и рестриктирующих эндонуклеаз

При выборе ДНК-маркеров для метода ПДРФ очень большое значение имеет уровень их гетерозиготности в популяции. Распределение в популяции аллельных вариантов того или иного



Рис. 21.2. Метод ПДРФ: блот-гибридизация по Саузерну.

локуса является случайным, поэтому ожидаемый уровень гетерозиготности (и информативность) маркерного локуса прямо связан с числом часто встречающихся в популяции аллелей: чем больше таких аллелей, тем выше вероятность того, что данный индивидуум будет по этому локусу гетерозиготен. В сообщении Комитета по ДНК 9-го совещания по картированию генома человека даны рекомендации по расчету информационной емкости полиморфизма (polymorphic information content, PIC) исходя из частот аллельных вариантов [18, 19]. Локусы с $PIC > 0,4$ многоаллельны и обычно содержат варьирующее число tandemных повторов (VNTR-локусы). Некоторые из таких локусов образуют гаплотипы [21]. Многие VNTR-локусы клонированы, и их можно использовать в качестве ПДРФ-маркеров [22]. Не менее важен и выбор рестриктирующей эндонуклеазы. Наибольшую разрешаю-

Таблица 21.1. Сайты узнавания для рестриктаз, наиболее часто применяемых для анализа ПДРФ, и условия рестрикции¹⁾

Рестриктаза	Сайт узнавания	Концентрация NaCl, mM	Температура рестрикции, °C
<i>Bam</i> HI	G:GATC	150	37
<i>Bgl</i> II	A:GATCT	100	37
<i>Eco</i> RI	G:AATTC	50	37
<i>Hind</i> III	A:AGCTT	50	37
<i>Msp</i> I	C:CGG	0	37
<i>Pst</i> I	CTGCA:G	100	37
<i>Pvu</i> II	CAG:CTG	50	37
<i>Taq</i> I	T:CGA	100	65

¹⁾ Составлено по данным каталогов фирм New England Biolabs (1988/1989) и Bethesda Research Laboratories (1990).

щую способность обеспечивают рестриктазы *Msp*I и *Taq*I (см. табл. 21.1). Достаточно часто используют и другие ферменты, например *Pst*I и *Bgl*II. Иногда приходится применять более двух рестриктаз.

4.2. Анализ ПДРФ

Обычный анализ ПДРФ состоит из двух этапов:

- рестрикция ДНК и электрофорез в агарозном геле;
- блот-гибридизация по Саузерну.

Первый из этих этапов описан в протоколе 21.6, а второй — в гл. 14. Типичные результаты анализа ПДРФ приведены на рис. 21.3. Вместо нитроцеллюлозных фильтров можно использовать нейлоновые [10, 14]: переносить на них ДНК проще и быстрее. Кроме того, нейлоновые фильтры прочнее нитроцеллюлозных и на них можно проводить повторные гибридизации. Если нуклеотидная последовательность полиморфного участка известна, то возможен и другой подход к анализу ПДРФ. Содержащий полиморфный сайт участок амплифицируют с помощью ПЦР и продукты амплификации обрабатывают соответствующей рестриктазой. Потерю или появление рестрикционного сайта определяют соответственно по наличию или отсутствию рестрицированного ПЦР-продукта. Этот метод можно применять и для анализа архивных препаратов.

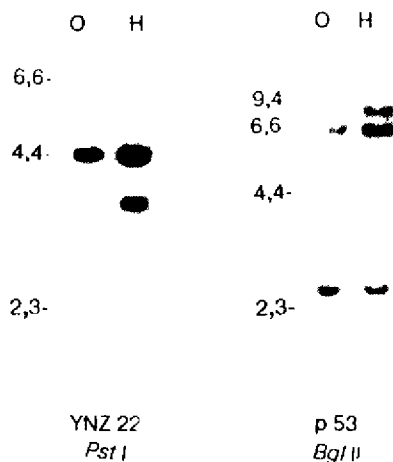


Рис. 21.3. Выявление ПГ в хромосоме 17p в опухолевых клетках с помощью ПДРФ. 10 мкг ДНК, рестрицированной *Pst*I или *Bgl*II, фракционировали в 0,8% агарозном геле, переносили на фильтр и гибридизовали с 32 P-зондами, полученными методом рассеянной заправки и картированными на коротком плече хромосомы 17: YNZ22 (VNTR-маркер) и p53 (ген — супрессор опухолей). Н — нормальная слизистая желудка, О — опухолевая ткань.

Протокол 21.6. Расщепление ДНК рестриктирующими эндонуклеазами и электрофорез в агарозном геле

Материалы

- 10 × рестрикционный буфер: 100 мМ трис-НCl, pH 7,5, 100 мМ MgCl₂, 10 мМ ДТТ и 0,5, 1,0 или 1,5 М NaCl¹⁰
- Рестриктазы (см. табл. 21.1)
- 10 × буфер для нанесения: 50% глицерин, 0,25% бромфеноловый синий, 0,25% ксилोलцианол, 100 мМ ЭДТА, pH 8,0
- 10 × ТБЭ: 0,89 мкМ основной трис, 0,89 М борная кислота, 20 мМ ЭДТА. pH доводят до 8,1–8,2 с помощью твердой борной кислоты
- Агароза для электрофореза
- Буфер ТЭ (см. протокол 21.1)
- Раствор бромистого этидия: 1000 × концентрированный раствор, 0,5 мг/мл, хранят в темноте
- Прибор для горизонтального гель-электрофореза

Протокол 21.6 (Продолжение)

Методика

1. В микроцентрифужную пробирку вносят 20 мкл 10 × рестрикционного буфера, x мкл ДНК (30 мкг) и доводят объем дистиллированной стерильной водой до 180 мкл²⁾.
2. Добавляют рестриктазу из расчета 1–5 ЕД/мкг ДНК. При этом объем добавляемого фермента не должен превышать 1/10 конечного объема реакционной смеси.
3. Инкубируют смесь при рекомендованной температуре (см. табл. 21.1) в течение ночи.
4. Рестрицированную ДНК очищают смесью фенол/хлороформ и переосаждают спиртом (см. гл. 12).
5. Осадок ДНК растворяют в ТЭ и определяют концентрацию ДНК (см. гл. 12).
6. К 10 мкг образца ДНК добавляют 3 мкл 10 × буфера для нанесения и доводят объем до 30 мкл с помощью ТЭ.
7. Наносят весь образец на агарозный гель и проводят электрофорез в 0,5 × ТВЭ³⁾.
8. Гель окрашивают бромистым этидием и просматривают его в УФ-свете (см. гл. 12).

¹⁾ Концентрация NaCl зависит от используемой рестриктазы (см. табл. 21.1).

²⁾ Объем раствора рестрицируемой ДНК или реакционной смеси можно менять, сохраняя постоянным соотношение между компонентами смеси.

³⁾ Концентрацию агарозного геля необходимо подбирать опытным путем (табл. 21.2).

Таблица 21.2. Концентрация агарозы в геле, используемая для разделения фрагментов ДНК разного размера

Агароза, %	Размер фрагментов, т. н.	Рестриктазы
0,8	от 20 до 10	<i>Bam</i> HI, <i>Pst</i> I <i>Bgl</i> II, <i>Eco</i> RI <i>Pvu</i> II
1,0	от 10 до 0,5	<i>Msp</i> I, <i>Taq</i> I
1,2	от 7 до 0,4	
1,5	от 4 до 0,2	

Литература

1. *Tahara E.* (1990). *Cancer Res. Clin. Oncol.*, **116**, 121.
2. *Aronson S. A., Tronick S. R.* (1985). In: *Important advances in oncology* (ed. V. T. DeVita). J. B. Lippincott, Philadelphia.
3. *Stanbridge E. J.* (1990). *Science*, **247**, 12.
4. *Innis M. A., Gelfand G. H., Sninsky J. J., White T. J.* (ed.) (1990). *PCR protocols, a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, California.
5. *Orita M., Suzuki Y., Sekiya T., Hayashi K.* (1989). *Genomics*, **5**, 874.
6. *Impraim C. C., Saiki R. K., Erlich H. A., Teplitz R. L.* (1987). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **142**, 710.
7. *Goetz S. E., Hamilton S. R., Vogelstein B.* (1985). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **130**, 118.
8. *Dubeau L., Chandler L. A., Gralow J. R., Nichols P. W., Jones P. A.* (1986). *Cancer Res.*, **46**, 2964.
9. *Jackson V.* (1978). *Cell*, **15**, 945.
10. *Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T.* (ed.) (1989). *Molecular cloning, a laboratory manual* (2nd edn). Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY.
11. *Kafatos F. C., Jones C. W., Efstratiadis A.* (1979). *Nucleic Acids Res.*, **7**, 1541.
12. *White B. A., Bancroft F. C.* (1982). *J. Biol. Chem.*, **257**, 8569.
13. *Janssen J. W. G., Lyons J., Steenvoorden A. C. M., Seliger H., Bartram C. R.* (1987). *Nucleic Acids Res.*, **15**, 5669.
14. *Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., Struhl K.* (ed.) (1987). *Current protocols in molecular biology*. John Wiley, New York.
15. *Kanazawa H., Noumi T., Futai M.* (1986). In *Methods in enzymology*, (ed. S. Fleischer, B. Fleischer). Vol. 126, p. 595. Academic Press, London.
16. *Orita M., Iwahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T.* (1989). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2766.
17. *Southern E. M.* (1975). *J. Mol. Biol.*, **98**, 503.
18. *Botstein D., White R. L., Skolnick M., Davis R. W.* (1980). *Am. J. Hum. Genet.*, **32**, 314.
19. *Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. D.* (ed.) (1989). *Molecular biology of the cell* (2nd edn). Garland Publishing, New York.
20. *Pearson P. L.* (1987). *Cytogenet. Cell Genet.*, **46**, 390.
21. *Kidd K. K., Bowcock A. M., Schmidtke J., Track R. K., Ricciuti F., Hutchings G. et al.* (1989). *Cytogenet. Cell Genet.*, **51**, 622.
22. *Nakamura Y., Leppert M., O'Connell P., Wolff R., Holm T., Culver M. et al.* (1987). *Science*, **235**, 1616.

СПИСОК ФИРМ, ПОСТАВЛЯЮЩИХ ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

American Type Culture Collection, 12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852, USA.

Amersham International plc, Lincoln Place, Green End, Aylesbury, Bucks HP20 2TP, UK.

Becton Dickinson, 1 Becton Drive, Franklin Lakes, New Jersey 07417-1880, USA. *Also*: Between Towns Road, Cowley, Oxford OX4 3ZY, UK.

Bethesda Research Laboratories, 8400 Helgerman Dourt, Gaithersburg, MD 20877, USA.

Bio 101 Inc., La Jolla, CA 92038-2284, USA.

Bio-Dyne B, Pall BioSupport, East Hills, NY, USA.

Bio-Rad Laboratories Ltd., Bio-Rad House, Marylands Avenue, Hemel Hempstead, Herts HP2 7TD, UK. *Also*: 3300 Regatta Drive, Richmond, California 94804, USA.

Boehringer Mannheim UK Ltd, Bell Lane, Lewes, East Sussex BN7 1LG, UK. *Also*: Boehringer Mannheim, PO Box 50414, Indianapolis, IN 46250, USA.

Cambridge Research Biochemicals, Gadbrook Park, Northwich, Cheshire CW9 7RA, UK. *Also*: Cambridge Research Biochemicals Inc., Wilmington, DE 19897, USA.

Continental Laboratory Products, 10171 Pacific Mesa Blvd, Suite 307, San Diego, CA 92121, USA.

CP Laboratories, PO Box 22, Bishop's Stortford, Herts CM23 3DH, UK.

Dako Ltd., 16 Manor Courtyard, Hughenden Avenue, High Wycombe, Bucks HP13 5RE, UK. *Also*: Dako Corporation, 6392 Via real, Carpinteria, CA 93013, USA.

Dynal, The Wirral, UK.

E. I. DuPont De Nemours and Co Inc., Market Street, 1007 Wilmington, Delaware 19898, USA. *Also*: DuPont UK Ltd., Wedgewood Way, Stevenage, Herts SG1 4QN, UK.

Fluka Chemie AG, Industriestrasse 25, CH-9470 Buchs, Switzerland. *Also:* Fluka Chemicals Ltd., Peakdale Road, Glossop, Derbyshire SC13 9YB, UK.

FMC-Bioproducts, 5 Maple Street, Rockland, Maine 04841, USA. *Also:* FMC-Bioproducts (Europe), Risingevej, DK-2665 Vallensbaek Strand, Denmark.

Gelman Sciences Ltd., 10 Harrowden Road, Brackmills, Northampton NN4 0EZ, UK.

Gibco BRL, PO Box 35, Trident House, Renfrew Road, Paisley PA3 4EF, Scotland.

Hoefer Scientific Instruments, 654 Minnesota Street, San Francisco, CA 94107, USA.

ILS Ltd, 761 Main Avenue, Norwalk, CT 06859, USA.

International Medical Products, Zutphen, The Netherlands.

Kartell Plastics (UK) Ltd, Unit L., Broad Lane, Cottenham, Cambridge, UK.

Life Technologies Inc., 8400 Helgerman Dourt, Gaithersburg, MD 20877, USA.

LTi Ltd., PO Box 35, Trident House, Renfrew Road, Paisley PA3 4EF, Scotland.

Miles Scientific (UK), PO Box 37, Stoke Court, Stoke Poges, Slough SL2 4LY, UK.

M. J. (Patterson) Scientific Ltd., Unit 2, Brookside, Colne Way, Watford, Herts WD2 4 QJ.

Nalgene, PO Box 20365, Rochester, NY 14602-0365, USA.

New England BioLabs Inc., 32 Tozer Road, Beverley, MA 01915-5599, USA.

Oncor Inc. (Molecular Cytogenetics), 209 Perry Parkway, Gaithersburg, MD 20877, USA.

Perkin-Elmer Cetus, 761 Main Avenue, Norwalk, CT 06859, USA.

Plasco Inc., 10 Jefferson Ave., Wolburn, MA, USA.

Promega, 2800 Woods Hollow Road, Madison, WI 53711-5399, USA. *Also:* Epsilon House, Enterprise Road, Chilworth Research Centre, Southampton SO1 7NS, UK.

Sarstedt Ltd., 68 Boston Road, Leicester LE4 1AW, UK.

Schleichel & Schnell, PO Box D-2254, Dassel, Germany.

Shandon Scientific, Chadwick Road, Astmoore, Runcorn, Cheshire WA7 1PR, UK.

Sigma Chemical Co., Fancy Road, Poole, Dorset BH17 7TG, UK. *Also:* PO Box 14508, St Louis, MO 63178, USA.

Sorvall™, E I DuPont De Nemours and Co. Inc., Market Street, 1007 Wilmington, Delaware 19898, USA. *Also:* DuPont UK Ltd., Wedgewood Way, Stevenage, Herts SG1 4QN, UK.

Stratech Scientific Ltd., 50 Newington Green, London N16, UK.

Stratagene Ltd., Cambridge Innovation Centre, Cambridge Science Park, Milton Road, Cambridge CB4 4GF, UK. *Also:* Stratagene Cloning Systems, 11099 North Torrey Pines Road, La Jolla, CA 92037, USA.

Techmate Ltd., 10 Bridgeturn Ave., Old Wolverton, Milton Keynes MK12 5QL, USA.

Techné Ltd., Duxford Road, Cambridge CB2 4PZ, UK.

US Biochemical Corporation, Box 22400, Cleveland, OH 44122, USA.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

Авидин 37, 96, 123, 147, 231, 341

LB-агар 332

Адгезивы 133

Аденовирусы 166

Аденокарцинома 424

Азид натрия 40, 77, 252

Акриламид 441, 460, 523

Аллель-специфичная гибридизация 517

Альфоидная ДНК 174, 257

Аминометилкумаринуксусная кислота 178, 181

3-амино-9-этилкарбазол (АЭК) 39, 41, 119, 127, 240

Амплификации в ДНК 18

Амплификация β -глобинового гена человека 455–457, 489

Анализ ДНК-гистограмм 291

- однопочечного конформационного полиморфизма 518, 523

- ПЦР-амплифицированной ДНК, жесткость условий 413

Анеуплоидные клетки 281, 293

- опухоли 195, 299

Антиген Ki-67 300

Антигены, идентификация иммуноцитохимическими методами 20

Анти-онкогены 517

Антитела, адсорбировавшие коллоидное золото 78

- выбор для целей диагностики 33, 55

- как маркеры при исследовании дифференцировки и трансформации клеток 20

- моноклональные, хранение в глицерине 14–15, 78

- первые 33

- поликлональные 15

- сайт-специфические 87

- хранение и работа с ними 34

Аспираты 259

Ацетиламинофлуорен (ААФ) 95–97, 139, 178

Ацетон, фиксация замороженных срезов 26, 32–33

Бактериальная клетка, введение плазмидной ДНК с помощью трансформации 329, 331–334

- хромосома 329

Бактериальные плазмиды 329

Бактерии, выращивание в селективной среде 498

- патогенные 498

- получение компетентных клеток 331–334

- с рекомбинантными плазмидами, отбор колоний 331

- трансформация плазмидами 331–334

Бактериологические методы исследований 13

Бактериофаг M13 428, 431

- - использование для определения нуклеотидной последовательности ДНК 431–432

- SP6 358

- T3 358

- T7 358

- λ 304

Бактериофаги 358

Белок D5 297

- ядерный р53 297, 300

- A 77, 80

- G 80

Биолюминесцентные метки 18

Биоптаты 449

- залитые в парафин 91, 136, 184, 226

Биотин 18, 37-38, 139, 143, 165, 178, 231, 234, 341, 391, 496

- использование при гибридизации *in situ* 95-97

- мечение РНК-зондов 142

- эндогенный 38, 165

Биотинилирование 84

Блоки тканей, заключенные в смолу 69

Блот-гибридизация ДНК 377, 381-383

- - ДНК-блоты по Саузерну 377-380

- жесткость условий 375, 383

- по Саузерну, выделение ДНК 303-304

- применение для изучения болезней человека 375

- РНК 383-389

Болезнь Альцгеймера 171

- Крейтцфельда-Якоба 171

Бромистый этидий 317-319, 336

Бромуридиндезоксирибозид (БУДР) 178, 295

Бромфеноловый синий 322-324

5-бром-4-хлор-3-индолил- β -D-галактозид 330, 431

5-бром-4-хлор-3-индолилфосфат (БХИФ) 118, 124, 126, 234-235, 240, 255, 392, 500

Бронхоальвеолярные смывы 219

Быстрый красный TR 43, 124, 127, 240

Ванадил-рибонуклеозидные комплексы 312

Вектор Bluescribe 204

- pBluescript 331, 358

- pGEM 358

- pSP 64/65 331

- pSP70 358

- pUC 329-331

Векторы для синтеза РНК 203-204

Вестерн-блоттинг 14

Вирус гепатита В 38, 166, 169, 424

- - - неспецифическое связывание авидина 38

- - - C 18

- иммунодефицита человека (ВИЧ) 16, 170

- папилломы человека (HPV) 16, 126, 144, 166, 256-257, 259, 424, 448, 474

- - - амплификация ДНК 448-449, 455-458, 476-484

- - - аногенитальные формы рака 448

- - - рак шейки матки 448, 474-475, 491-493

- - - стратегия скрининга 479-483

- - - типов 6 и 11 448-449, 474, 477-479, 481

- - - 16 и 18 448-449, 464, 474, 477, 479, 481, 493

- - - частота обнаружения разных типов 491

- - - эпидемиологический анализ 449

- простого герпеса человека (HSV) 166, 168, 259

- Эпштейна-Барр (EBV) 16, 169-170, 418, 424-425

- HTLV-1 424

Вирусная ДНК 105

Внутриутробная инфекция 168

Волосистая лейкоплакия 169

Выделение ДНК 303

- и очистка плазмидной ДНК 334-339

- нуклеиновых кислот 303-319

- РНК 310

- - ингибиторы РНКаз 311-312

Вырожденные праймеры 448

Выявление амплификации генов 524

- точковых мутаций 517

- β-Галактозидаза, отбор рекомбинантных клонов 330
- Гематоксиллин 148
- Генотерапия наследственных заболеваний 302
- Генотипирование клеток 14
- Гены актина 225
 - тубулина 225
 - уникальные 91
 - E6 449, 458—459
- Гепатит В 169
 - и цитомегаловирусы (CMV) 168
- Гепатоцеллюлярная карцинома 424
- Гетерогенность опухолей 186
- Гибридизационная смесь 111, 382
- Гибридизация 14, 93, 232
 - аллель-специфичная 517
 - в растворе 374
 - двойная и тройная 129, 181, 198, 254—256
 - использование ДНК- и РНК-зондов 374, 496—497
 - ПЦР-амплифицированной ДНК по Саузерну 411—413
 - in situ (ГИС) 16, 91, 173
 - - автоматизация 125
 - - аутопсийный материал 220
 - - ацетилирование 106, 138
 - - биоптаты, полученные при хирургических операциях 219
 - - выбор зондов 230—231
 - - - молекулы-свидетеля 95—96
 - - - неизотопной метки 231
 - - демаскирование нуклеиновых кислот 105—108
 - - денатурация 232
 - - и гибридизация 108, 146, 249—251
 - - детекция 234
 - - гибридизовавшегося зонда 115, 147, 160, 179—181, 234—237, 253—255
 - - диагностика вирусных заболеваний 16
 - - ДНК 91, 136, 173, 244
 - - жесткость условий 109—111, 114—115
 - - интерпретация результатов 258
 - - использование в молекулярной клинической диагностике 132
 - - - при анализе архивных препаратов 223—224
 - - - - выявлении вирусов 244
 - - - контроли и специфичность 98, 120, 148, 216, 225, 256—257
 - - - концентрация зондов 146, 153, 233
 - - - культуры тканей 220
 - - - мечение зондов 139—140, 205, 207
 - - - неизотопные варианты 93—96, 149 150, 177—178, 231
 - - - неспецифические взаимодействия нуклеиновых кислот 217
 - - - обработка кислотой 106, 137
 - - - - предметных стекол 209—210, 227
 - - - окрашивание проб 148
 - - - отмыwanie препаратов после гибридизации 213, 233, 251—252
 - - - перспективы применения при изучении патологических процессов 242—243
 - - - подготовка тканей 208, 211, 226, 229
 - - - полимеразная цепная реакция (ПЦР) 19
 - - - получение материала и подготовка препаратов 244
 - - - предгибридизация 232
 - - - применение в клинической практике 91, 129, 166, 259
 - - - - при изучении неопластической трансформации клеток 242
 - - - принципы 93
 - - - радиоавтография 147, 155
 - - - размер зонда 233
 - - - реагенты 125
 - - - специфичность 93, 216, 258
 - - - срезы замороженных тканей 102—103, 136, 188, 209, 227

- структурная организация хромосом 16
- условия 146
- ферменты 96—97
- - - фиксация препаратов 102—105, 181—182, 209, 228, 246—249
- характер зонда 96—97, 138
- цитологические препараты 220
- - - чувствительность 91—92, 139, 163, 166, 219, 224, 246
- эндоскопические биоптаты 220
- 8-гидроксидехинолин 306
- Гистологическое окрашивание 125
- Гликольметакрилат (ГМА) 31
- Глиоксаль 384
- Глицериновое желе 119
- Глобиновые гены 225, 256
- β -Глобиновый ген 414, 455—457, 489
- Глутаральдегид 71, 181
- Глутаральдегид-формальдегидные смеси 72
- Гормоны, изучение иммуноцитохимическими методами 20
- Гуммиарабик 82

- Декальцификация 30
- Декстрасульфат 377
- Делеции 376
- в ДНК 18
- Депротенинизация при выделении ДНК 304
- Детергенты 57
- Диагностика заболеваний, сцепленных с полом 15
- 3,3'-диаминбензидин (ДАБ) 39—42
- Дигоксигенин 18, 95—97, 139, 178, 231, 234, 341—342
- мечение РНК-зондов 142
- Диметилсульфоксид (ДМСО) 323, 384
- Диметилформамид (ДМФ) 392
- Динитрофенол 139
- Дисплазия 474, 493
- Дитиотрейтол (ДТТ) 362
- Дифференциальное окрашивание хромосом 194
- Диэтилпирокарибонат (ДЭПК) 226—227, 311, 360
- ДНК альфондная 174
- амплификации 18
- амплифицированная, выход 411
- анализ с помощью гель-электрофореза 321
- вируса папилломы человека, амплификация с помощью ПЦР 448—449, 478—480
- выделение 303
- - быстрым фенольным методом 307
- - из крови 305
- - - пятен крови 509—511
- - с использованием протеиназы К 304
- высокомолекулярная 309—310
- делеции 18
- и РНК, одновременное выделение 316
- изготовление дот-блотов 380
- измерение концентрации 326
- индекс 288
- качественный анализ 321
- количественный анализ 326
- мечение в ходе полимерной цепной реакции 354—358
- - 3'-концов 367—371
- - 5'-концов 366
- митохондриальная 303, 445
- наборы для мечения 342
- одноцепочечная в роли матрицы 351
- окрашивание 286, 293—297
- определение нуклеотидной последовательности 428
- осаждение этанолом 304
- очистка экстракцией фенолом и хлороформом 360—364
- плазмидная, выделение и очистка 334—339
- - - из небольшого объема бактериальной культуры 336

- - кольцевая, очистка 335
- ПЦР-амплифицированная 429—431, 445, 522
- - прямое секвенирование 445
- радиоактивно меченная 149—152
- расщепление рестриктирующими эндонуклеазами 529
- с высокой удельной радиоактивностью 346
- сателлитная 174
- фрагменты 304
- хранение 328
- чистота препаратов 321
- экстракция фенолом : хлороформом 306—309, 312, 316—317, 321, 360, 518—519

ДНКазы I 346—349

ДНК-гистограммы 281

ДНК-зонды 140

- меченные ферментами 500

- - ^{32}S 151

ДНК-полимераза 1, использование при секвенировании ДНК 437

ДНК-полимераза *Taq* 356, 399, 402, 408, 415, 451, 455, 503, 510, 523

- фага T7, использование для секвенирования ДНК 438

ДНК-стандарты 287, 292

Додецилсульфат натрия (ДСН) 312, 335

Дот-блот-гибридизация 340, 376

- ПЦР-амплифицированной ДНК 412, 413, 462—471, 503—505, 520

Дрожжевой экстракт 332

E. coli, продуцирующие энтеротоксин 498

- *EcoK*-негативный штамм 431

Желатина с алюмохромовыми квасцами 23, 133, 181

Жесткость условий гибридизации 109—111

Заболевания с отсроченной манифестацией 171

- сцепленные с полом, диагностика 15

Замороженные срезы 188

Затравка рассеянная 100, 178

Золото 43—44

Зонд, смывание с фильтра 393

- специфичный для хромосомы 1 (pVC 1.77) 174

Зонды, мечение биотином 102, 352, 357

- - диоксигенином 102, 352, 357

- - методом рассеянной затравки 351

- - с помощью полимеразной цепной реакции 354—357, 464

- меченные ^{32}P 91, 139

- - ^{35}S 139, 206—207

- - - получение с помощью никотрансляции 140

- неизотопно меченные, выявление 391

- олигонуклеотидные 101, 143, 364—365

- размер 208

- удельная радиоактивность 354

Идентификация личности 422—423

Изолированные клетки, суспензия 190—194

Изопропанол 304, 339, 466

Иммуноглобулиновые гены с перестройками 425

Иммунологические методы исследования 13

Иммуномечение коллоидным золотом 79—86

- с использованием пероксидазы—антипероксидазы (ПАП) 35—36

- - - щелочной фосфатазы—антищелочной фосфатазы (ЩФАЩФ) 35—36

Иммуноокрашивание неспецифическое 55

- титр 55

- Иммуноцитохимические методы --- G2 196, 293
 20-21
 - - выбор блока ткани 29
 - - - метки 38-44
 - - - системы иммуномечения 34
 - - гибридизация *in situ* 53, 125-129, 215
 - - изготовление препаратов 21, 31
 - - качество срезов 22
 - - красители для контрастирования 52
 - - обесцветивание препаратов 52
 - - предметные стекла, прикрепление срезов 23
 - - фиксация цитологических препаратов 33
 - - центрифугирование материала 32
 - - чувствительность 21
 Ингибиторы РНКаз 311
 Индекс ДНК 173
 Инсулин 68
 Интерлейкин-5 204
 Интерфазная цитогенетика 173
 Информационная емкость полиморфизма (PIC) 527
 Иодацетамид 212
 Иодацетат натрия 324
 Индистый пропиций (ИП) 286
- Кариотипирование 194-197
 Карцинома яичников 187
 Кератит 168
 Рар-классификация 474
 Клетки безъядерные 258
 - изолированные 190-194
 - койлоцитные 258
 - линии CaSki 163, 256, 456
 - - HeLa 163, 456
 - - SiHa 163, 456, 489
 Клеточные линии 224
 - сортеры 280
 Клеточный цикл, стадия G0 196
 - - - G1 196, 293
- Клинические образцы, анализ мазков 449, 451
 - - - соскобов 449, 451
 Колит и цитомегаловирус 168
 Количественный ПЦР-анализ 417
 Колонии, перенос с селективной среды на твердую подложку 498-499
 Колоний-стимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов 221
 Комплекс стрептавидин-щелочная фосфатаза 148
 α -Комплементация 331
 Консервативные последовательно-сти-мишени 399
 - праймеры 448
 Корректирующие праймеры 490-491
 Космидные векторы 304
 Костный мозг, опухолевые клетки 195
 Коэффициент вариации (CV) 292
 Криостатные срезы 23
- Латентные вирусные инфекции 92
 Левамизол 43, 165
 Лейкоз 15, 194
 - Т-клеточный 424
 Лизин 26
 Лизоцим 335, 339, 503
 Лимфома 15, 170, 187
 - Беркитта 169, 424
 - неходжкинская 278-279, 295
 Лocus D1S80 507
- Мазки шейки матки 244-245, 258
 Матрицы в полимеразной цепной реакции 355
 Мезотелиома 187
 Мейоз 263
 Меланин 56

- Меланома, окрашивание AgЯОР 276–277
- Меркаптоэтанол 306, 314, 346
- Метанол 32
- Метапериодат натрия 26, 79
- Метиленовый зеленый 148
- Метод анализа однопочечного конформационного полиморфизма (SSCP) 18
- интерфазной цитогенетики 173
 - рассеянной заправки 349–354
 - - - радиоактивное мечение 351–352
 - - - фрагмент Кленова 350–351
 - термации цепи 428
- Мечение ДНК методом рассеянной заправки 349–354
- - ник-трансляция 346–349
 - зондов, очистка от невключившихся нуклеотидов 344
 - - с помощью полимеразной цепной реакции 144
 - 3'-концов олигонуклеотидов 367
 - 5'-концов олигонуклеотидов 367
 - нуклеиновых кислот, основные методы 342
- Миелодиспластический синдром 424
- Миелома 424
- Микроорганизмы, конструирование и выбор зондов 497
- молекулярная детекция 496
 - патогенные, выявление с помощью ПЦР 501–502
- Митотические хромосомы 263
- Множественное иммуномечение 67, 83–86
- Множественный ПЦР-тест 415
- Молекулярная клиническая диагностика 13
- Молекулярное клонирование, методы 302, 429
- Молекулярный анализ нуклеиновых кислот 302
- Молоко обезжиренное 116, 123
- Мононуклеоз инфекционный 169
- Морфометрический анализ опухолевых клеток 173
- Муковисцидоз 376
- Мутации, идентификация 445
- Мышечная дистрофия Дюшена 376
- Набор хромосом в клетках и гибридизация 15**
- Назофарингеальная карцинома 169
- Найлоновые фильтры 377, 393, 528
- Направленное клонирование 429
- Нативные мазки 244
- Невирусная пневмония 16
- Неизотопная гибридизация in situ (НГИС), высокое разрешение 177
- Нейроэндокринная система (НЭС) 66–67
- Неполное излечение болезни 424
- Нерадиоактивные методы анализа 19
- - мечения 91, 159, 174, 231, 235, 244
- Ник-трансляция 98–102, 140–142, 178, 346–349
- мечение биотином 348
 - нерадиоактивное мечение 346–348
 - радиоактивное мечение 346–348
 - с использованием диоксигенина 348
- Нитросиний тетразолий (НСТ) 118, 234–235, 240, 255, 392, 500
- Нитроцеллюлозный фильтр 377, 393, 505
- Новый фуксин 43, 127
- Нозерн-блот-гибридизация 340
- Нозерн-блоттинг 14, 17, 216–217
- Нозерн-блоты 383–385
- РНК, денатурированной формальдегидом/формамидом 385–387
- Нуклеиновые кислоты, выделение 303–319
- - измерение концентрации 326
 - - количественный анализ 326
 - - методы мечения зондов 342
 - - молекулярный анализ 302

- - нерадиоактивное мечение 341
- - окрашивание бромистым этидием 327
- - определение первичной структуры (секвенирование) 14, 17
- - пришивание к фильтру с помощью УФ-света 377, 379, 381, 412, 505
- - хранение 328

- Обратная транскриптаза 350
- транскрипция 237
- Однопочечные ДНК-зонды 100
- Однопочечный конформационный полиморфизм (SSCP) 18
- Окрашивание двойное и тройное 58
- ДНК 286, 293—297
- свежеполученных клеток 246
- фоновое 59
- Олиго-зонды 143, 364—365, 449, 468
- удельная радиоактивность 371
- Олигонуклеотиды длинные и их мечение 371
- концевое мечение 143
- - - биотином 367
- - - дигоксигенином 370
- Онкогенные белки 22
- Онкогены 302, 376, 517
- мутантные 18, 242
- Опухоли, гетерогенность 186
- дезинтеграция препаратов 182
- желудка 194, 197
- мозга 194
- молочных желез 277
- мочевого пузыря 187, 194—196
- определение гетерогенности 197
- солидные 15
- тетрасомия 191
- яичек 194, 196
- Опухоль, первичная локализация 424
- Органосилан 23, 104, 133, 181, 227
- Острый миелобластоз 424
- Очистка poly (A)⁺-РНК 319

- Параформальдегид 26, 71, 136, 209, 228, 403
- Пепсин 13, 105, 107, 126, 230, 247
- Первичная структура нуклеиновых кислот 14
- Первые антитела 33
- Пероксидаза, использование в электронной микроскопии 66—67
- Пероксидаза хрена (ПХ) 39—41, 178, 252
- эндогенная 39—40, 114, 123
- Пероксидазы и псевдопероксидазы 469
- Персульфат аммония 440
- Плазмида, содержащая клонированную ДНК HPV 490
- Плазмидная ДНК, выделение и очистка 334—339
- - - с использованием хлорамфеникола 334
- Плазмиды 329—372
- бактериальные 97
- выделение из большого объема бактериальной культуры 334
- - - промежуточного объема бактериальной культуры 334
- - - щелочным методом 335
- выход ДНК на 1 мл бактериальной культуры 338
- кольцевые 335—336
- очистка методом центрифугирования в равновесном градиенте плотности в присутствии красителя 336
- Пневмония и цитомегаловирус 168
- невирусная 16
- сопутствующая СПИДу 170
- Поливинилпирролидон 112, 232, 250, 382, 504
- Поли-L-лизин (ПЛЛ) 23, 75, 133, 181, 227
- Полилинкер 204, 329—330
- Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 14
- - - автоматизация 423

- амплификация РНК 397
- анализ амплифицированной ДНК 410—413, 458—461, 512
- архивных препаратов 410
- выбор контролей 414, 455
- оптимального праймера 429
- выделение ДНК из срезов 404
- выявление вирусов 422
- денатурация ДНК 407
- идентификация личности 422—423
- изготовление срезов 403—404
- интерпретация результатов 413—419
- использование для идентификации личности 400
- меры предосторожности 356, 403, 419—422, 455, 509
- методы нерадиоактивного мечення 357, 465—467
- на отдельных клетках 475
- опасность загрязнения 403, 419—422, 455, 490
- подбор праймеров 398, 408
- применение в клинике 422—425
- сравнение с другими методами 395, 397
- температура отжига 407
- точность 402
- установление отцовства 17, 507
- фиксация ацетоном 403
- этанолом 402—403
- фиксированные ткани 402—408, 453
- число циклов 401
- чувствительность 397, 401, 415, 449, 455, 502
- Полиморфизм длины амплифицированных фрагментов (ПДАФ) 507
- рестрикционных фрагментов (ПДРФ) 17, 376, 507, 517, 526
- Последовательности-мишени, обработка ДНКазой 121, 225
- Потеря гетерозиготности (ПГ) 517
- выявление с помощью метода ПДРФ 526
- Праймер биотинилированный 445
- универсальный 428
- oligo (dT) 239
- Праймеры вырожденные 448
- гнездовые 401
- консервативные 448, 476, 489
- корректирующие 490—491
- содержащие инозин 490
- Предгибридизация 232
- Предопухолевое состояние 18
- Предшественники рибосом 262
- Пренатальная диагностика заболеваний 17
- Препараты цитологические, приготовленные с помощью центрифугирования 135, 245
- Проверка антител 34
- Пролиферация ядерных белков 300
- Проназа 27, 105
- Протеаза 27
- Протеиназа К 27, 105, 107, 126, 138, 149, 216—230, 247, 304, 305, 312, 313, 321
- Проточная цитометрия 16, 173, 280
- диагностика рака молочной железы 299
- изучение препаратов, залитых в парафин 284
- исследование солидных опухолей 281
- определение плотности опухолевых клеток 16
- содержания в клетке ДНК 281
- РНК 281
- приготовление клеточных суспензий 281
- применение в клинической диагностике 299
- Пузырный занос 197
- ПЩР-зонды 144—146
- ПЩР-продукты, гибридизация и детекция 467
- ПЩР-секвенирование асимметричное 445

- Радиоавтография 133, 212–215, 444
 - зондов 389–391
 - при гибридизации *in situ* 147
 - poly (A)⁺-РНК на Нозерн-блотах 390
 Радиоактивное мечение зондов 341, 351, 487–488
 Радиоиммунологический анализ 132
 Районы адрышковых организаторов 16, 261
 Рак молочной железы 194
 - предстательной железы 194
 - прямой кишки 300
 - шейки матки 16, 474–475, 491–493
 - - - мазки 474–475
 Рестриктаза *Bam* H1 528
 - *Bgl* II 528
 - *Eco* RI 429–430, 528
 - *Hin* dIII 429–430, 528
 - *Msp* I 528
 - *Pvu* II 528
 - *Taq* I 528
 Рестриктазы-изоизомеры 376
 Рестрикционный анализ L1-фрагментов HPV 461–471
 Рестрикция ДНК 528–530
 Ретинит 168
 Ресепторы Т-клеток 425
 Рибо-зонды 101, 123, 142, 203
 - антисмысловые 204–205
 - выбор радиоактивной метки 207
 - смысловые 205, 217, 225
 Рибосомы 261–262
 РНКазин 362
 РНК 91, 106, 136, 203, 223
 - 18 S 323, 324
 - 28 S 323, 324
 - анализ с помощью гель-электрофореза 323
 - вторичная структура 374
 - выделение 310
 - - с помощью гуанидинтиоцианата 314
 - денатурированная глиоксалем и ДМСО, электрофорез 323
 - измерение концентрации 326
 - качественный анализ 321
 - количественный анализ 326
 - хранение 328
 - чистота препаратов 321
 - электрофорез в агарозном геле 323
 мРНК 13, 19, 375
 РНКазы 310–311
 РНК-дот-блоты, изготовление 386–389
 РНК-зонды 142, 203–205
 - возможности применения 364
 - меченные ³⁵S 156, 208
 - нерадиоактивно меченные 364
 - обработка РНКазой 147
 - синтез 358–364
 РНК-полимераза SP6 142, 358, 362
 - T3 358, 362
 - T7 358, 362
 РНК-полимеразы 358
 Робертсоновские транслокации 263
 Родамин 178, 181
 Ртутный пигмент 56
 Руть 95–97, 139, 178
 Саркозил 305
 Саркома Капоши 170
 Сателлитная ДНК 174
 Саузерн-блот-гибридизация 340, 376
 Секвенирование 17, 437–440
 - ДНК, контроль лигирования 434
 - - лигирование вектора и вставки 434
 Секреторные гранулы 67
 Семинома 196
 Серповидноклеточная анемия 376
 Сефадекс G-50 141
 Синдром Дауна 15
 Синтез РНК-зондов 358
 Системы авидин-биотиновые 37
 Скрининг HPV 489–493
 Смолы акриловые 74
 - для ЭМ-иммуноцитохимии 74
 - эпоксидные 74
 Сблизные опухоли 15

Соскобы шейки матки 475
 Спаривание хромосом 192
 Спинномозговая жидкость 408
 Среда LB 332
 - SOB 332, 435
 - SOC 332
 - TY 436
 Срезы, заключенные в смолу 31
 - замороженные 188
 - криостатные 23
 - нанесение конъюгата непрямым методом 35
 - - - прямым методом 34
 - обработка ДНКазой 105
 - - до гибридизации, удаление парафина 137
 - - РНКазой 105, 121, 217, 225
 - полученные из лиофилизированных блоков 30
 - протеолиз 137
 - тканевые, прикрепление к предметным стеклам 23
 - трепанобиоптатов костного мозга 25
 - ультратонкие 69
 Стрептавидин 37, 148, 231, 341, 393, 445, 470
 Судебно-медицинская экспертиза 507

Талассемия 376
 Температура гибридизации 232
 - отжига 355
 - плавления 109–111, 114, 146, 168, 232, 374–375
 Терминальная дезоксиинуклеотидилтрансфераза 367–371
 Тетраплоидизация 197
 Тетроксид осмия 71
 Тканевые пигменты 56–57
 - срезы, заключенные в парафин 26
 - - изготовление препаратов 22
 - - фиксация 27

Толуидиновый синий 76
 Тонкоигольная аспирационная биопсия 31, 70
 Тонкослойная хроматография 366
 Точковые мутации в гене *Ki-ras* 424, 522
 - - - - *N-ras* 424
 - - выявление 517
 Трансгенные животные 302
 Транскрипция *in situ* 237–238, 240
 - *in vitro*, выбор вектора 358
 - - - использование ^{32}P 205–208
 - - - ^{35}S 206–207
 - - - иерadioактивное мечение 362
 - - - получение ДНК-матрицы 258–360
 Транслокации 192
 Трепанобиоптаты костного мозга 25
 Трипсин 27, 126
 Трисомии 192–193
 Тритий, использование при мечении зондов 139

Удельная радиоактивность меченых зондов 354
 Универсальный праймер 428
 Установление отцовства 17, 507

Фаговая ДНК, получение одноцепочечных рекомбинантных молекул 434
 Факторы роста 22
 Фенол, насыщенный буфером 306
 Фенотипирование 14
 Ферментная обработка парафиновых срезов 186–187
 Ферментный иммуносорбентный метод (ELISA) 132
 Фибриллярные центры 265–266, 276
 Фиксация глутаральдегидом 209
 - метакарном 403
 - метанолом/ацетоном 181

- метанолом/уксусной кислотой 181, 228
- препаратов 32, 69
- срезов 27
- Фильтры, хранение после гибридизации 393
- Фицин 27
- Флуоресценнизоотиоцианат (ФИТЦ) 39, 178, 181
- Флуорохромы 18, 143, 180—181
- Формальдегид 86, 181, 325, 514, 518
- Формамид 32, 111, 147, 209, 211, 232, 381, 384—387
- Фотобиотин 341
- Фаргмент Клёнова 350—352, 437
- Фуксин 148

- Хелатирующие вещества 30
- Хемилюминесцентные метки 18
- Хемилюминесцентный метод 393
- Хламидии 18
- Хлористый кальций 331
- Хранение нуклеиновых кислот 328
- Хромогранин А 221
- Хромосома 1 174, 195—197
 - 7 195—196
 - 9 195
 - 13 261, 263
 - 14 261, 263
 - 15 261, 263
 - 18 196
 - 21 261, 263
 - 22 195, 261, 263
 - X 197
 - Y 197
- Хромосомные аномалии 173—174, 181, 259
 - транслокации 425
- Хромосомный полиморфизм 192
- Хромосомы 91, 174
 - дифференциальное окрашивание 194
 - маркерные 195, 263
- Хронический миелолейкоз 424

- Центрифугирование в градиенте плотности CsCl 314—315, 317, 336, 339
 - на колонках с сефадексом 345
- Цирроз 170
- Цитомегаловирус (CMV) 16, 18, 168, 170
- oligo (dT)-целлюлоза 303, 319

- Чистота препаратов ДНК и РНК 321

- Шиффовы основания 403, 518

- Щелочная фосфатаза 42, 118, 123—124, 143, 160, 178, 234—235, 240, 255, 393, 500
 - - колориметрическое определение 393, 501
 - - субстраты для выявления 42—43
- Щелочной гидролиз длинных зондов 208

- Электронная микроскопия 66 68
 - - использование соединений, меченых коллоидным золотом, 66, 69
- Электрофорез в агарозном геле 321—326, 411, 529
 - - полиакриламидном геле 440—443
 - ПЦР-продуктов локуса DIS80 513
- ЭМ-иммуноцитохимия, количественная обработка данных 89
- приготовление образцов 70, 76
- тест на адсорбцию 87
- фиксация препаратов 69—73
- Эндогенная ферментативная активность 123, 252
 - - - пероксидазы 39, 114, 252
 - - - щелочной фосфатазы 114
- Эндогенные нуклеазы 304
- Эндогенный биотин 165
- Энцефалопатии, цитомегаловирусы и вирусы простого герпеса 168
- Эпитопы 14
- Эфир биотина, мечение зондов 341

Ядерные белки 300

Ядрышковые организаторы 16, 261

- - выявление иммуногистоцитохимическими методами 273—275

- - - на хромосомах 263

- - - при гибридизации *in situ* 272—274

- - - с помощью ионов Bi^{3+} 271

- - - - электронная микроскопия 269

- - и кариотипирование 278

- - - пролиферативная активность клеток 276

- - - проточная цитометрия 278

- - определение на интерфазных хромосомах 276—278

- - техника анализа изображений 277

- - фиксация препаратов 268

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	5
Список авторов	7
Список сокращений	11
Глава 1. Молекулярные методы, использующиеся в клинической диагностике Джеймс О'Д. Макги	13
1. Введение	13
2. Молекулярная клиническая диагностика	14
2.1. Фенотипирование	14
2.2. Генотипирование	15
2.3. Анализ экстрактов тканей	16
2.4. Перспективы	18
Литература	19
Глава 2. Иммуноцитохимия: световая микроскопия Эндрю Р. Хермет, Кевин С. Гаттер	20
1. Введение	20
2. Выбор иммуноцитохимического метода	20
3. Изготовление препаратов	21
3.1. Тканевые срезы	22
3.2. Мазки	31
4. Первые антитела	33
4.1. Проверка антител	34
4.2. Хранение антител и работа с ними	34
5. Система иммуномечения	34
5.1. Выбор системы иммуномечения	34
5.2. Выбор метки	38
5.3. Выбор метода	44
6. Контроли	47
6.1. Контроль реагентов	47
6.2. Контроль процедур	48
7. За лабораторным столом	49
7.1. Оборудование и реактивы	49
7.2. Подготовка к окрашиванию	50
7.3. Реагенты	50
7.4. Работа с препаратами	51
7.5. Специальные красители и красители для контрасти- рования	52
7.6. Проблема нехватки материала	52
7.7. Совмещение иммуноцитохимического анализа с гиб- ридизацией in situ	53

7.8. Автоматизация	53
8. Улучшение качества иммуноокрашивания	54
8.1. Время инкубации	54
8.2. Температура инкубации	55
8.3. Титр	55
8.4. Встряхивание	55
8.5. Уменьшение неспецифического окрашивания	55
8.6. Тканевые пигменты	56
8.7. Дeterгенты	57
8.8. Срезы	57
8.9. Повторное наслаивание	57
8.10. Комбинация методов	58
9. Двойное и тройное окрашивание	58
9.1. Последовательное окрашивание	58
9.2. Одновременное окрашивание	58
10. Некоторые проблемы и способы их решения	59
10.1. Другие замечания	59
Литература	64

Глава 3. Иммуноцитохимия: электронная микроскопия *Сузан Ван Норден, Энни Е. Бишоп, Катрин М. Тимсон, Джулия М. Полак* **66**

1. Введение	66
2. Практические аспекты	69
2.1. Приготовление образцов	70
2.2. Фиксация	71
2.3. Смолы	74
2.4. Приготовление срезов	76
2.5. Иммуномечение	76
2.6. Контроли	87
2.7. Фоновое мечение	88
2.8. Неожиданный отрицательный результат	88
2.9. Количественная обработка данных	89
Литература	89

Глава 4. Методика выявления ДНК/РНК с помощью гибридизации in situ *Саймон Херрингтон, Джеймс О'Д. Макги* **91**

1. Введение	91
2. Выбор методики	92
2.1. Нуклеиновая кислота-мишень	92
2.2. Чувствительность	92
2.3. Специфичность	93
2.4. Лабораторные аспекты	93
3. Принципы гибридизации in situ	93
3.1. Выбор молекулы-свидетеля	95
3.2. Характер зонда и его мечение	97
3.3. Фиксация препаратов и подготовка предметных стекол	102
3.4. Предварительная обработка срезов	105
3.5. Денатурация и гибридизация	108

3.6. Отмывание образцов после гибридизации и ингибирование эндогенной ферментативной активности . . .	113
3.7. Детекция гибридизовавшегося зонда . . .	115
4. Контроли . . .	120
4.1. Положительные контроли . . .	120
4.2. Отрицательные контроли . . .	120
5. Возможные причины неудач . . .	121
5.1. Растрескивание срезов или нарушение морфологии тканей . . .	121
5.2. Слабый сигнал или полное его отсутствие . . .	122
5.3. Невоспроизводимость результатов . . .	122
5.4. Высокий фон . . .	123
6. За лабораторным столом . . .	124
6.1. Оборудование . . .	124
6.2. Реактивы . . .	125
6.3. Автоматизация . . .	125
7. Комбинирование методов . . .	125
7.1. Гибридизация <i>in situ</i> и гистологическое окрашивание . . .	125
7.2. Гибридизация <i>in situ</i> и иммуноцитохимия . . .	125
7.3. Многократная гибридизация <i>in situ</i> . . .	129
8. Использование метода гибридизации <i>in situ</i> для диагностики заболеваний . . .	129
Литература . . .	129

Глава 5. Обнаружение вирусных генов методом гибридизации <i>in situ</i> Стина М. Сирьянен . . .	132
1. Введение . . .	132
2. Принципы метода . . .	132
2.1. Подготовка предметных стекол . . .	133
2.2. Изготовление образцов . . .	134
2.3. Обработка срезов до гибридизации . . .	137
2.4. Зонды . . .	138
2.5. Денатурация . . .	146
2.6. Условия гибридизации . . .	146
2.7. Промывание препаратов после гибридизации . . .	146
2.8. Системы детекции . . .	147
2.9. Окрашивание . . .	148
3. Контроль специфичности . . .	148
4. Стандартные протоколы . . .	149
4.1. Гибридизация ДНК, содержащейся в цитологических препаратах, с ^{35}S -ДНК-зондами . . .	149
4.2. Гибридизация ДНК, содержащейся в гистологических срезах, с ^{35}S -ДНК-зондами . . .	151
4.3. Гибридизация РНК, содержащейся в тканевых срезах, с ^{35}S -РНК-зондами . . .	156
4.4. Гибридизация с биотинилированными ДНК-зондами . . .	158
5. Интерпретация результатов . . .	161
6. Количественная оценка . . .	162
7. Чувствительность метода ГИС . . .	163
8. Проблемы, возникающие при гибридизации <i>in situ</i> . . .	164

9. Применение гибридизации <i>in situ</i> в клинической диагностике	166
9.1. Вирус папилломы человека	167
9.2. Цитомегаловирус	168
9.3. Вирус простого герпеса	168
9.4. Вирус Эпштейна—Барр	169
9.5. Вирус гепатита В	169
9.6. Вирус иммунодефицита человека	170
9.7. Другие вирусы	171
Литература	171

Глава 6. Выявление генетических нарушений в опухолевых клетках Антон Х. Н. Хопман, Пино Поддиге, Олаф Мускер, Франс С. Рамакерт	173
1. Введение	173
2. Методологические аспекты	173
2.1. ДНК-зонды	174
2.2. Мечение зондов и их детекция	177
2.3. Гибридизация <i>in situ</i> с несколькими мишенями	181
3. Методические аспекты гибридизации <i>in situ</i>	181
3.1. Фиксация и обработка препаратов	181
3.2. Предварительная обработка препаратов обидных опухолей	182
3.3. Определение числа гибридизационных сигналов и интерпретация результатов	190
4. Практическое применение	194
4.1. Интерфазная цитогенетика и кариотипирование	194
4.2. Интерфазная цитогенетика и проточная цитометрия	196
4.3. Определение гетерогенности опухолей	197
5. Заключение	198
Литература	199

Глава 7. Локализация клеточных мНРК в клинических препаратах с помощью изотопно меченных РНК-зондов К. А. Хамид	203
1. Введение	203
2. Получение зондов	203
2.1. Субклонирование ДНК-матрицы в векторе для синтеза РНК	203
2.2. Линеаризация вектора	204
2.3. Транскрипция <i>in vitro</i> и мечение зондов	205
2.4. Выбор радиоактивной метки	207
2.5. Размер зонда	208
3. Подготовка тканей	208
3.1. Работа с тканями	208
3.2. Фиксация	209
3.3. Обработка предметных стекол	209
3.4. Получение срезов	210
4. Предварительная обработка клеток и тканей	211
5. Гибридизация	212

6. Отмывание препаратов после гибридизации	213
7. Радиоавтография	214
8. Одновременное проведение гибридизации <i>in situ</i> и иммуноцитохимического анализа	215
9. Контроли и специфичность гибридизации <i>in situ</i>	216
9.1. Ткань	216
9.2. Зонд	217
9.3. Специфичность гибридизации	217
9.4. Гистологический контроль	218
10. Количественные определения	218
11. Интерпретация данных	218
12. Требования к безопасности экспериментов по гибридизации <i>in situ</i> с применением радиоактивных изотопов	219
13. Некоторые примеры ГИС с мРНК в клинических препаратах с использованием изотопно меченных кРНК-зондов	219
13.1. Биоптаты, полученные при хирургических операциях	219
13.2. Эндоскопические биоптаты	220
13.3. Цитологические препараты	220
13.4. Аутопсийный материал	220
13.5. Культуры тканей	220
Литература	222

Глава 8. Выявление мРНК в клинических препаратах с помощью неизотопной гибридизации *in situ* *Эрик Яп, Хуан-Карлос Мартинес-Монтеро, Джеймс О'Д. Макги*

223

1. Введение	223
1.1. Клеточные линии как модельные системы	224
1.2. Контроли	225
2. Получение образцов тканей и подготовка их к гибридизации	226
2.1. Предупреждение загрязнения РНКазам	226
2.2. Образцы	227
2.3. Фиксация	228
2.4. Демаскирование нуклеиновых кислот	229
3. Гибридизация <i>in situ</i>	230
3.1. Зонды	230
3.2. Предгибридизация	232
3.3. Денатурация	232
3.4. Гибридизация	232
3.5. Отмывание после гибридизации	233
3.6. Детекция	234
4. Транскрипция <i>in situ</i>	237
5. Заключение	242
Литература	243

Глава 9. Применение гибридизации *in situ* для диагностики цитопатологий *Саймон Херрингтон, Джеймс О'Д. Макги*

244

1. Введение	244
-------------------	-----

2. Получение материала и подготовка препаратов	244
3. Фиксация препаратов и демаскирование нуклеиновых кислот	246
3.1. Фиксация	246
3.2. Демаскирование нуклеиновых кислот	247
4. Денатурация и гибридизация	249
5. Отмывание препаратов после гибридизации и детекция	251
5.1. Отмывание	251
5.2. Детекция гибридизовавшегося зонда	253
6. Контроли	256
6.1. Параллельный контроль	256
6.2. Внутренний контроль	256
7. Интерпретация результатов	258
7.1. Локализация сигнала	258
7.2. Чувствительность метода	258
7.3. Специфичность	258
8. Практическое применение гибридизации <i>in situ</i>	259
Литература	260

Глава 10. Районы ядрышкового организатора и фибриллярные центры *Джон Крокер*

1. Введение	261
2. Методы выявления ЯОР/фибриллярных центров	262
2.1. Применение	263
2.2. Окрашивание серебром ЯОР метафазных хромосом	264
2.3. Окрашивание серебром интерфазных фибриллярных центров	265
3. Более редкие методы выявления ЯОР	269
3.1. Ультроструктурный метод	269
3.2. Метод, основанный на связывании ионов висмута	271
3.3. Гибридизация <i>in situ</i>	272
3.4. Последовательное применение иммуногистохимических методов и окрашивания Ag	273
3.5. Иммуноцитохимическое выявление белков, ассоциированных с ЯОР	276
4. Количественное определение AgЯОР на интерфазных хромосомах	276
4.1. Техника анализа изображений	277
4.2. Размер AgЯОР	278
5. Применение методов, основанных на анализе интерфазных AgЯОР, в гистопатологии	278
Литература	279

Глава 11. Применение проточной цитометрии в молекулярной клинической диагностике *Ричард С. Кампблджон* ...

1. Введение	280
1.1. Общие принципы проточной цитометрии	280
1.2. Измерение содержания ДНК	281
2. Приготовление клеточных суспензий	281
2.1. Дезагрегация свежих солидных опухолей	281

2.2. Суспендирование архивных препаратов, залитых в парафин	284
3. Окрашивание ДНК	286
3.1. Использование другой ДНК в качестве стандарта	287
3.2. Методы окрашивания ДНК	287
4. Проточная цитометрия	290
4.1. Анализ ДНК-гистограмм	291
5. Мультипараметрические измерения	293
5.1. Одновременное определение содержания ДНК и поверхностных антигенов	294
5.2. Определение содержания ДНК и включения бром-урацилдезоксирибозидов	295
5.3. Одновременное определение содержания ДНК и ядерных или цитоплазматических антигенов	296
6. Применение проточной цитометрии в клинической диагностике	299
6.1. Определение содержания ДНК	299
6.2. Одновременное определение содержания ДНК и клеточных антигенов	300
Литература	300

Глава 12. Выделение нуклеиновых кислот из клинических образцов и клеточных культур *Виктор Т.-В. Чан* . . . 302

1. Молекулярный анализ нуклеиновых кислот и изучение болезней человека	302
1.1. Выделение нуклеиновых кислот	303
2. Выделение ДНК	303
2.1. Выделение ДНК с использованием протеиназы К	304
2.2. Выделение ДНК с помощью быстрого фенольного метода	307
2.3. Выделение высокомолекулярной ДНК	309
3. Выделение РНК	310
3.1. Выделение РНК с использованием протеиназы К	312
3.2. Выделение РНК с помощью гуанидинтиоцианата	314
4. Одновременное выделение ДНК и РНК	316
5. Очистка poly(A) ⁺ -РНК	319
6. Анализ РНК и ДНК	321
6.1. Качественный анализ	321
6.2. Количественный анализ нуклеиновых кислот	326
7. Хранение нуклеиновых кислот	328
Литература	328

Глава 13. Получение зондов и их мечение *Юлия Е. Стикланд* . 329

1. Введение	329
2. Бактериальные плазмиды	329
2.1. Основные положения	329
2.2. Получение компетентных клеток <i>Escherichia coli</i> и их трансформация бактериальными плазмидами	331
2.3. Выделение и очистка плазмидной ДНК	334
3. Мечение нуклеиновых кислот	340
3.1. Введение	340

3.2. Радиоактивное мечение по сравнению с нерадиоактивным	341
3.3. Основные методы	342
4. Мечение двухцепочечной ДНК	346
4.1. Метод нуклеотидного замещения (ник-трансляция)	346
4.2. Метод рассеянной затравки	349
4.3. Получение зондов с помощью полимеразной цепной реакции	354
5. Синтез РНК-зондов методом транскрипции <i>in vitro</i>	358
5.1. Кодированные бактериофагами ДНК-зависимые РНК-полимеразы	358
5.2. Выбор вектора	358
5.3. Получение ДНК-матрицы	360
5.4. Транскрипция	361
5.5. Преимущества РНК-зондов и возможности их применения	364
6. Получение олигонуклеотидных зондов	364
6.1. Типы олигонуклеотидных зондов и их применение	364
6.2. Мечение 5'-концов	366
6.3. Мечение 3'-концов	367
7. Заключение	371
Литература	372

Глава 14. Гибридизация нуклеиновых кислот *Виктор Т.-В. Чан* 374

1. Введение	374
1.1. Применение блот-гибридизации для изучения болезней человека	375
2. Блот-гибридизация	376
2.1. Блот-гибридизация ДНК	377
2.2. Блот-гибридизация РНК	383
2.3. Выявление гибридизовавшихся зондов	390
3. Хранение фильтров после гибридизации	393
Литература	394

Глава 15. Полимеразная цепная реакция и молекулярно-генетический анализ биоптатов *Даррил К. Шибата* 395

1. Введение	395
1.1. Полимеразная цепная реакция	395
1.2. Амплификация РНК	397
2. Общие положения	398
2.1. Подбор праймеров	398
2.2. Число циклов	401
2.3. Точность	402
3. Работа с образцами тканей	402
3.1. Нативные ткани	402
3.2. Фиксированные ткани	402
3.3. Спинномозговая жидкость	408
3.4. Ткани, замороженные в среде, обеспечивающей оптимальные условия разрезания при данной температуре (ОСТ)	409

3.5. Архивные препараты	410
3.6. ПЦР <i>in situ</i>	410
4. Анализ ПЦР-амплифицированной ДНК	410
4.1. Подготовка ПЦР-продуктов	410
4.2. Гель-электрофорез	411
4.3. Гибридизация ПЦР-амплифицированной ДНК по Сау- зерну	411
4.4. Дот-блот-гибридизация ПЦР-амплифицированной ДНК	412
5. Интерпретация результатов	413
5.1. Выбор контролей	414
5.2. Чувствительность	415
5.3. Количественный ПЦР-анализ	417
6. Загрязнения	419
6.1. Возможности применения ПЦР в целях клинической диагностики	419
6.2. Лабораторная практика	420
6.3. Если загрязнение уже произошло	422
7. Применение ПЦР в клинической лаборатории	422
Литература	425

Глава 16. Определение нуклеотидной последовательности

ДНК Мейрион Б. Ллуэлин	428
1. Введение	428
2. Получение ПЦР-амплифицированной ДНК	429
3. Подготовка векторной ДНК бактериофага M13	431
4. Лигирование векторной и ПЦР-амплифицированной ДНК	434
5. Получение одноцепочечной рекомбинантной фаговой ДНК	434
5.1. Выделение одноцепочечной ДНК	436
6. Секвенирование	437
7. Электрофорез в геле	440
7.1. Подготовка секвенирующего геля	440
7.2. Нанесение образцов и проведение электрофореза	443
7.3. Радиоавтография	444
8. Прямое секвенирование ПЦР-амплифицированной ДНК	445
Литература	447

Глава 17. Применение ПЦР для диагностики папилломавирус- ных инфекций гениталий Хейди М. Бауэр, Катрин

Е. Грир, М. Мишель Мано	448
1. Введение	448
1.1. Полимеразная цепная реакция: обзор	448
1.2. Применение ПЦР в клинике	449
2. Обработка клинических образцов	450
2.1. Мазки и соскобы	451
2.2. Цервикально-вагинальный смыв физиологическим раствором	452
2.3. Ткани, заключенные в парафин	453

3. Амплификация	455
3.1. Предупреждение загрязнений	455
3.2. Амплификация гена L1 HPV и β -глобинового гена человека	455
3.3. Амплификация гена E6 HPV	458
4. Анализ ПЦР-продуктов: электрофорез	460
4.1. Электрофорез в полиакриламидном геле	460
4.2. Рестрикционный анализ L1-фрагментов HPV	461
5. Анализ ПЦР-продуктов: дот-блот-гибридизация	462
5.1. Приготовление дот-блотов	462
5.2. Синтез консервативных L1-зондов	464
5.3. Гибридизация и детекция	467
6. Применение молекулярных методов в лабораторных исследованиях	471
Литература	472

Глава 18. Применение полимеразной цепной реакции

для скрининга вирусов папилломы человека при

цитопатологиях шейки матки Ян М. М. Валбомерс,
Питер У. Дж. Мелкерт, Адриан Дж. Ван ден Брюль,
Питер Дж. Ф. Снейдерс, Крис Дж. Л. М. Мейер

474

1. Введение	474
2. Изготовление препаратов для ПЦР	475
3. Выявление вируса папилломы человека в соскобах с шейки матки	476
3.1. Консервативные и типоспецифичные праймеры	476
3.2. Стратегия скрининга HPV	479
3.3. Некоторые замечания, касающиеся скрининга HPV	489
4. Клинические аспекты	491
4.1. Частота обнаружения HPV в препаратах	491
4.2. Перспективы выявления и цитологического скрининга HPV	493
Литература	494

Глава 19. Обнаружение и идентификация патогенных микроорганизмов молекулярными методами Брюс Дж.

Маккреди, Джозеф А. Чимера

496

1. Введение	496
2. Конструирование и выбор зондов	497
3. Обнаружение патогенных микроорганизмов кишечной группы методом гибридизации на колониях	497
3.1. Подготовка образцов для гибридизации	498
3.2. Гибридизация нуклеиновых кислот, фиксированных на нитроцеллюлозных или нейлоновых фильтрах, с ДНК-зондами, мечеными ферментами	500
4. Обнаружение патогенных микроорганизмов в клинических образцах с помощью ПЦР	501
Литература	506

Глава 20. Идентификация личности: анализ полиморфизма длины амплифицированных фрагментов <i>Марсия Эйзенберг, Джозеф А. Чимера</i>	507
1. Введение	507
2. Выделение ДНК	509
3. Амплификация локуса D1S80	510
4. Анализ ПЦР-продуктов	512
5. Интерпретация результатов	514
Литература	516
Глава 21. Анализ ДНК в архивных образцах и его применение для изучения патогенеза опухолей <i>В. Ясуи, Х. Ито, Е. Тахара</i>	517
1. Введение	517
2. Выявление точковых мутаций	517
2.1. Аллель-специфичная гибридизация	518
2.2. Прямое секвенирование ПЦР-амплифицированной ДНК	522
2.3. Анализ SSCP	523
3. Выявление амплификации генов	524
4. Выявление потери гетерозиготности (ПГ) с помощью ме- тода ПДРФ	526
4.1. Выбор маркеров и рестриктирующих эндонуклеаз	526
4.2. Анализ ПДРФ	528
Литература	531
Список фирм, поставляющих оборудование и материалы	532
Предметный указатель	535

Научное издание

Молекулярная клиническая диагностика
Методы

Под ред. С. Херрингтона, Дж. Макги

Заведующий редакцией

М. Р. Погосбекова

Ведущий редактор

Н. Н. Шафрановская

Редактор

Р. Ф. Куликова

Художник

Ю. Л. Максимов

Технический редактор

Е. В. Денюкова

Оригинал-макет подготовлен С. А. Янковой
в пакете QuarkXPress

Лицензия ЛР № 010174 от 20.05.97г.

Подписано к печати 31.03.99 г. Формат 60х90/16.

Гарнитура Newton Печать офсетная Бумага офс. № 1

Объем 17,50 бум. л. Усл.-печ. л. 35,00. Уч.-изд. л. 34,38.

Изд. № 4/9445. Тираж 4000 экз. Заказ 1263. С010

Издательство «Мир»

Государственного комитета Российской Федерации по печати.

129820, Москва, 1-й Рижский пер., 2.

Отпечатано в Производственно-издательском комбинате ВИНТИ,

140010, г. Люберцы, Московской обл., Октябрьский пр-т, 403.

Тел. 554-21-86